

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kristýna Barvíková

Buněčné mechanismy regulace kanálu TRPA1

Cellular mechanisms of TRPA1 channel regulation

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Ivan Barvík Jr., PhD.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Bc. Kristýna Barvíková

Abstrakt

TRPA1 je teplotně citlivý iontový kanál z ankyrinové podrodiny Tranzientních Receptorových Potenciálových (TRP) receptorů. Tyto proteiny hrají významnou roli v převodu širokého spektra vnějších a vnitřních signálů. Kanál TRPA1, který je hojně exprimován v primárních aferentních neuronech, je významný převodník různých škodlivých a dráždivých podnětů a účastní se také detekce změn teploty. Podobně jako ostatní TRP kanály je TRPA1 tvořen čtyřmi podjednotkami, přičemž každá podjednotka obsahuje šest transmembránových segmentů (S1-S6) ohraničených cytoplazmatickým N- a C-koncem. V nativních tkáních je receptor TRPA1 regulován několika fosforylačními místy, která jsou významná z hlediska aktivity TRPA1 za fyziologických a různých patofyziologických podmínek.

Za použití mutační metody jsme predikovali a prozkoumali roli potenciálních fosforylačních míst pro proteinkinasu C ve funkci TRPA1, která zvyšuje aktivitu tohoto receptoru. Naše výsledky identifikují rezidua, u kterých fosfomimikující mutace ovlivnila schopnost kanálu reagovat na napěťové a chemické podněty, zatímco mutace za alanin nebo glycin, která znemožňuje fosforylaci na daném místě, funkci kanálu neovlivnila. Identifikovali jsme serin 602 v rámci šestnácté N-koncové ankyrinové repetice, jehož substituce za aspartát překvapivě zcela blokovala aktivitu TRPA1, přičemž míra exprese daného proteinu na povrchu buňky byla zachována. Kromě toho bylo zjištěno, že fyzikálně-chemické vlastnosti tohoto rezidia mají kritický význam pro funkci kanálu. Byly využity metody molekulárního modelování pro prozkoumání nezbytných strukturních požadavků pro aktivaci kanálu. Zjistili jsme, že nejen náboj, ale také velikost Ser602 a jeho specifické okolí jsou důležité pro správnou funkci kanálu.

Naší hypotézou je, že Ser602 může být potenciálním fosforylačním místem TRPA1, které je nezbytné pro vrátkování kanálu. Určení příslušné kinasy zodpovědné za snížení aktivity TRPA1 vyžaduje další studium. Alternativním vysvětlením je, že správná konformace N-koncové ankyrinové repetice 16 v okolí Ser602, je nepostradatelná pro správnou funkci kanálu.

Klíčová slova: ankyrinový tranzientní potenciálový kanál 1; fosforylace; TRP kanál; serin/threonin kinasa; vrátkování; ankyrinová repetice; PKC

Abstract

TRPA1 is a thermosensitive ion channel from the ankyrin subfamily of Transient Receptor Potential (TRP) receptors. These proteins play essential roles in the transduction of wide variety of environmental and endogenous signals. TRPA1, which is abundantly expressed in primary nociceptive neurons, is an important transducer of various noxious and irritant stimuli and is also involved in the detection of temperature changes. Similarly to other TRP channels, TRPA1 is comprised of four subunits, each with six transmembrane segments (S1–S6), flanked by the cytoplasmic N- and C-terminal ends. In native tissues, TRPA1 is supposed to be regulated by multiple phosphorylation sites that underlie TRPA1 activity under physiological and various pathophysiological conditions.

Using mutational approach, we predicted and explored the role of potential phosphorylation sites for protein kinase C in TRPA1 functioning. Our results identify candidate residues, at which phospho-mimicking mutations affected the channel's ability to respond to voltage and chemical stimuli, whereas the phospho-null mutations to alanine or glycine did not affect the channel activation. Particularly, we identify the serine 602 within the N-terminal ankyrin repeat domain 16, the substitution of which to aspartate completely abolished the TRPA1 activity but did not abrogate its cell surface expression. Moreover, the physicochemical properties of the residue at this position were found to be of critical importance and we used molecular modelling to explore the essential structural requirements for channel activation. We found that not only charge but also the size of this residue and its specific environment are important for the proper channel functioning.

We hypothesize that Ser602 might be a potential TRPA1 phosphorylation site vital for channel gating. Identification of the relevant kinase responsible for the abrogation of TRPA1 activity requires further studies. Alternatively, a proper conformation of the N-terminal ankyrin repeat 16 centred around the serine at position 602, is indispensable for proper channel gating.

Key words: Ankyrin transient receptor potential subtype 1; phosphorylation; TRP channel; serine/threonine kinase; gating; ankyrin repeat; PKC

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce Viktorii Vlachové za perfektní vedení a pomocnou ruku po celou dobu experimentů a psaní diplomové práce a za vytvoření skvělého prostředí v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala všem kolegům z oddělení Buněčné neurofyzologie, především Viktorovi Sinicovi, který mne seznámil s elektrofyziologickou technikou *patch-clamp*, dále Lucii Zímové a Lucii Máčikové za poskytnutí cenných rad pro práci v laboratoři. Velký dík patří také Magdě Kuntošové za přípravu buněčných linií pro všechny experimenty.

Obsah

Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	8
1. Úvod.....	11
1.1 Ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál.....	11
1.2 Struktura kanálu TRPA1	12
1.2.1 Transmembránová oblast.....	14
1.2.2 Cytoplazmatický N-konec	17
1.2.3 Cytoplazmatický C-konec	17
1.2.4 Strukturní modelování TRPA1	19
1.3 Aktivátory TRPA1	20
1.3.1 Elektrofilní aktivátory	21
1.3.2 Neelektrofilní aktivátory	23
1.4 Regulace TRPA1 signálními drahami	23
1.5 Proteiny interagující s TRPA1	25
1.5.1 Interakce TRPA1 s TRPV1	25
1.5.2 Interakce TRPA1 s AKAP79/150	25
2. Cíle práce	28
3. Materiál a metody	29
3.1 Chemikálie	29
3.2 Biologický materiál.....	29
3.3 Přístroje	30
3.4 Roztoky	30
3.5 Postup práce	31
3.5.1 Polymerázová řetězová reakce	31
3.5.2 Kontrola přítomnosti PCR produktů pomocí horizontální elektroforézy	33
3.5.3 Transformace ultrakompetentních XL10-Gold buněk <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku	34

3.5.4	Amplifikace vybraných kolonií buněk <i>E. coli</i>	34
3.5.5	Izolace plazmidové DNA	35
3.5.6	Transfekce plazmidu kódujícího mutantní konstrukty TRPA1 do buněk HEK293T	35
3.5.7	Elektrofyzilogická měření	36
3.5.8	Konfokální mikroskopie	37
3.5.9	Molekulární modelování	39
3.5.10	Napětová a chemická aktivace TRPA1.....	43
3.5.11	Vyhodnocování dat z elektrofyzilogických a mikroskopických měření	44
4.	Výsledky	47
4.1	Výsledky sekvenování plazmidů připravených pomocí PCR.....	47
4.2	Senzitizace kanálu TRPA1	47
4.3	Vliv přítomnosti AKAP zakotvujícího proteinu na funkci TRPA1	48
4.4	Výběr potenciálních fosforylačních míst TRPA1	50
4.5	Proudově-napětová charakterizace potenciálních fosforylačních míst TRPA1	52
4.6	Molekulární modelování – charakterizace oblasti Ser602	54
4.7	Expres variant TRPA1 na plazmatické membráně.....	54
4.8	Proudově-napětová charakterizace funkčních záměn aminokyselinových zbytků z oblasti Ser602 v přítomnosti agonistů.....	58
5.	Diskuze	60
6.	Závěr	66
	Seznam použité literatury	68
	Přehled publikací	76

Seznam zkratek

AC	adenylátcyklasa
AITC	allylisothiokyanát
AKAP79/150	zakotvující protein pro proteinkinasu A 79/150 (angl. A-kinase anchoring protein)
apo-TRPA1	struktura TRPA1 bez navázaného agonisty
AR	ankyrinová repetice (angl. ankyrin repeat)
ARD	doména ankyrinových repetit (angl. ankyrin repeat domain)
BITC	benzylisothiokyanát
BODIPY-IA	<i>N</i> -(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacene-3-yl)methyljodoacetamid
CaM	kalmodulin
CaM/Ca ²⁺	komplex kalmodulinu s navázanými vápenatými ionty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CdK5	cyklin-dependentní kinasa 5
CNS	centrální nervová soustava
DAG	diacylglycerol
DRG	zadní kořeny míšní (angl. dorsal root ganglia)
ECS	extracelulární roztok (angl. extracellular solution)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EF-hand	strukturní motiv vyskytující se v TRPA1
FTS	fetální telecí sérum
GFP	zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein)
GINAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (angl. G-protein coupled receptors)
HEK293T	lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (angl. human embryonic kidney cells)
hTRPA1	lidský ortolog receptoru TRPA1
IAA	jodoacetamid
ICS	intracelulární roztok (angl. intracellular solution)

IFH	označení krátkého helixu rozlišeného v nových strukturách TRPA1 (angl. interfacial helix)
IP ₃	inositoltrifosfát
IP ₃ R	receptory pro inositoltrifosfát
JT010	2-chloro- <i>N</i> -(4-(4menthoxyphenyl)thiazol-2yl)- <i>N</i> -(3-methoxypropyl)-acetamid
KcsA	označení draselného kanálu
Kv1.2	označení draselného kanálu
LB médium	kultivační médium pro bakterie (angl. lysogeny broth)
LJ potenciál	Lennardův-Jonesův potenciál
MATra	magnetické částice využité k transfekci buněk
mCherry-PH	plekstrinová doména podjednotky γ fosfolipázy C značená mCherry fluorescenčním proteinem
MD	molekulární dynamika
MDFF	molekulárně dynamické flexibilní „fítování“ (angl.. molecular dynamics flexible fitting)
NAMD	softwarový balík využívaný pro MD (angl. nanoscale molecular dynamics)
NPT	označení systému s konstantním tlakem a teplotou
NVE	označení systému s konstantní celkovou energií
P1 – P2	označení pórových helixů 1 a 2 TRPA1
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerasová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PDB	proteinová databáze (angl. protein data bank)
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PME	Particle Mesh Ewald
POPC	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
PP2B	fosfatasa 2B, kalcineurin
RII	podjednotka PAK
ROS	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)

S1 až S6	označení transmembránových α -helixů 1 až 6 TRPA1
SDM	místně zaměřená mutagenese (angl. site-directed mutagenesis)
SP1	monoanion fosfátu
SP2	dianion fosfátu
SNP	jednonukleotidové polymorfismy (angl. single nucleotide polymorphism)
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
tGFP	turbo zelený fluorescenční protein (angl. Turbo green fluorescent protein)
Tmem100	transmembránový protein 100
TRP	tranzientní receptorový potenciál (angl. transient receptor potential)
TRPA1	ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1 (angl. transient receptor potential ankyrin 1)
TRPC1-7	kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-7 (angl. classical transient receptor potential subtype 1-7)
TRP-like	strukturně analogický motiv k TRP-boxu TRPV1
TRPM1-8	melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-8 (angl. melastatin transient receptor potential subtype 1-8)
TRPML1-3	mukolipinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 (angl. mucolipin transient receptor potential subtype 1-3)
TRPP1-3	polycystinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 (angl. polycystin transient receptor potential subtype 1-3)
TRPV1-6	vaniloidní tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-6 (angl. vanilloid transient receptor potential subtype 1-6)
WT	přirozený typ (angl. wild type)

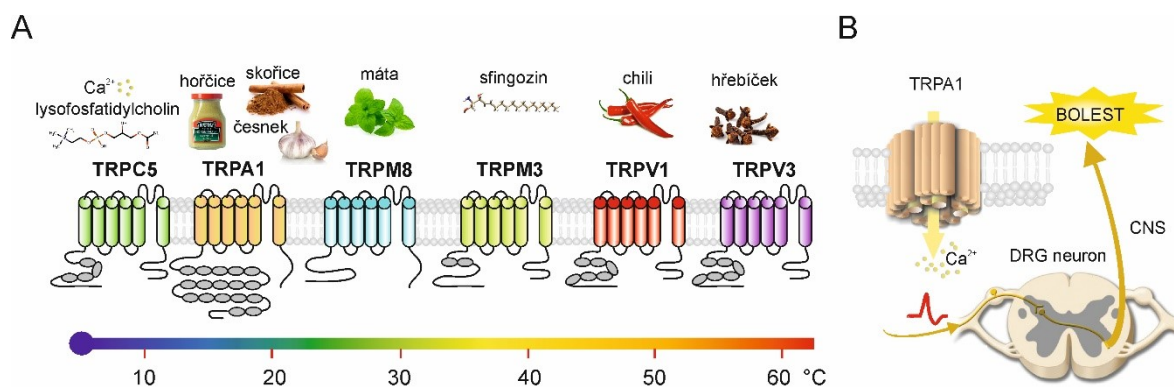
1. Úvod

1.1 Ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál

Ankyrinový tranzientní receptorový kanál 1, TRPA1 (z angl. ankyrin transient receptor potential subtype 1), je neselektivní kationtový kanál propustný pro vápenaté, sodné a draselné ionty [1]. K jeho biosyntéze dochází na primárních aferentních senzoriálních neuronech [1-3], v keratinocytech [4], v epitelu dýchacích cest [5], fibroblastech [6], odontoblastech [7], astroglích [8], Schwannových buňkách [9], endoteliálních buňkách, arteriálních cévách [4] a v synoviocytech [10]. Savčí TRPA1, byl poprvé objeven v lidských fibroblastech v roce 1999 [6] a jeho funkce iontového kanálu byla popsána o čtyři roky později [1]. Popis jeho struktury pomocí kryoelektronové mikroskopie v roce 2015 [11] umožnilo strukturně-funkční studium TRPA1 z hlediska mechanismu aktivace a účinku.

Kanál TRPA1 patří do rozsáhlé rodiny tranzientních receptorových potenciálových kanálů, které se vyskytují v celé řadě buněčných typů a zejména v nervovém systému zprostředkovávají odpověď organismu na celou škálu vnějších podnětů (viz Obrázek 1A a B, str. 12) [12, 13]. Mezi aktivátory TRP kanálů se řadí chemické sloučeniny, teplo, chlad, mechanické podněty, osmolarita, oxidativní stres či změny pH prostředí [14]. TRP kanály se řadí do evolučně konzervované skupiny ionotropních transmembránových receptorů, které se dělí do šesti rodin: kanonické TRPC1-7, melastatinové TRPM1-8, vaniloidní TRPV1-6, ankyrinové TRPA1, polycystinové TRPP1-3 a mukolipinové TRPML1-3 kanály [15]. Důležitou funkcí specifické podskupiny teplotně citlivých TRP kanálů je zajištění odpovědi na rozsáhlou škálu teplot od fyziologických po patofyziologické (0–70 °C) (viz Obrázek 1A, str. 12). Mezi chladové senzory se řadí TRPM8 a TRPC5, přičemž úloha TRPA1 v chladové citlivosti není dosud plně objasněna. Současné výsledky podporují hypotézu, že fyziologická úloha TRPA1 jako teplotního senzoru se v průběhu evoluce změnila jako důsledek adaptace organismů na vnější prostředí [16, 17]. U bezobratlých a u nižších obratlovců je iontový kanál TRPA1 aktivován teplem (teploty vyšší než ~40 °C) [18-24], některým druhům plazů umožňuje detekci a transdukcii infračervených signálů [18]. U savců byl TRPA1 dlouho považován za chladový receptor [1, 3, 25-28]. V nedávné době však bylo prokázáno, že tento iontový kanál zprostředkovává také důležitou fyziologickou úlohu v detekci bolestivého tepla [29-

31]. Přímá chladová aktivace byla potvrzena pro myši, potkaní a lidský ortolog TRPA1 experimenty na různých pracovištích [1, 26, 28, 32, 33]. Některým skupinám se však přímou chladovou aktivaci nepodařilo prokázat [18, 34-37]. Nedávné studie ukazují, že lidský kanál TRPA1 je za určitých podmínek skutečně chladovým senzorem [38]. U myši je TRPA1 spolu s TRPV1 a TRPM3 odpovědný za citlivost na škodlivé teplo – genetickým odstraněním těchto tří kanálů dojde ke ztrátě citlivosti na vysoké teploty za současného zachování citlivosti na chlad a mechanické podněty [30].



Obrázek 1: Teplotní a chemická aktivace TRP kanálů v senzoričných neuronech. A) Teplotně citlivé TRP kanály neboli „Thermo-TRP“ kanály jsou aktivovány celou škálou fyziologických až patofyziologických teplot. Pro TRP kanály je typická aktivace chemickými látkami vyvolávajícími palčivý, dráždivý až bolestivý pocit. B) Aktivace TRPA1 kanálu způsobí průnik vápenatých iontů do cytoplazmy a vznik akčního potenciálu na neuronech zadních kořenů míšních (angl. dorsal root ganglia neuron, DRG neuron). Signál je následně veden do centrální nervové soustavy (CNS), kde v konečném důsledku vyvolá bolestivý vjem. Převzato a upraveno z bakalářské práce [39].

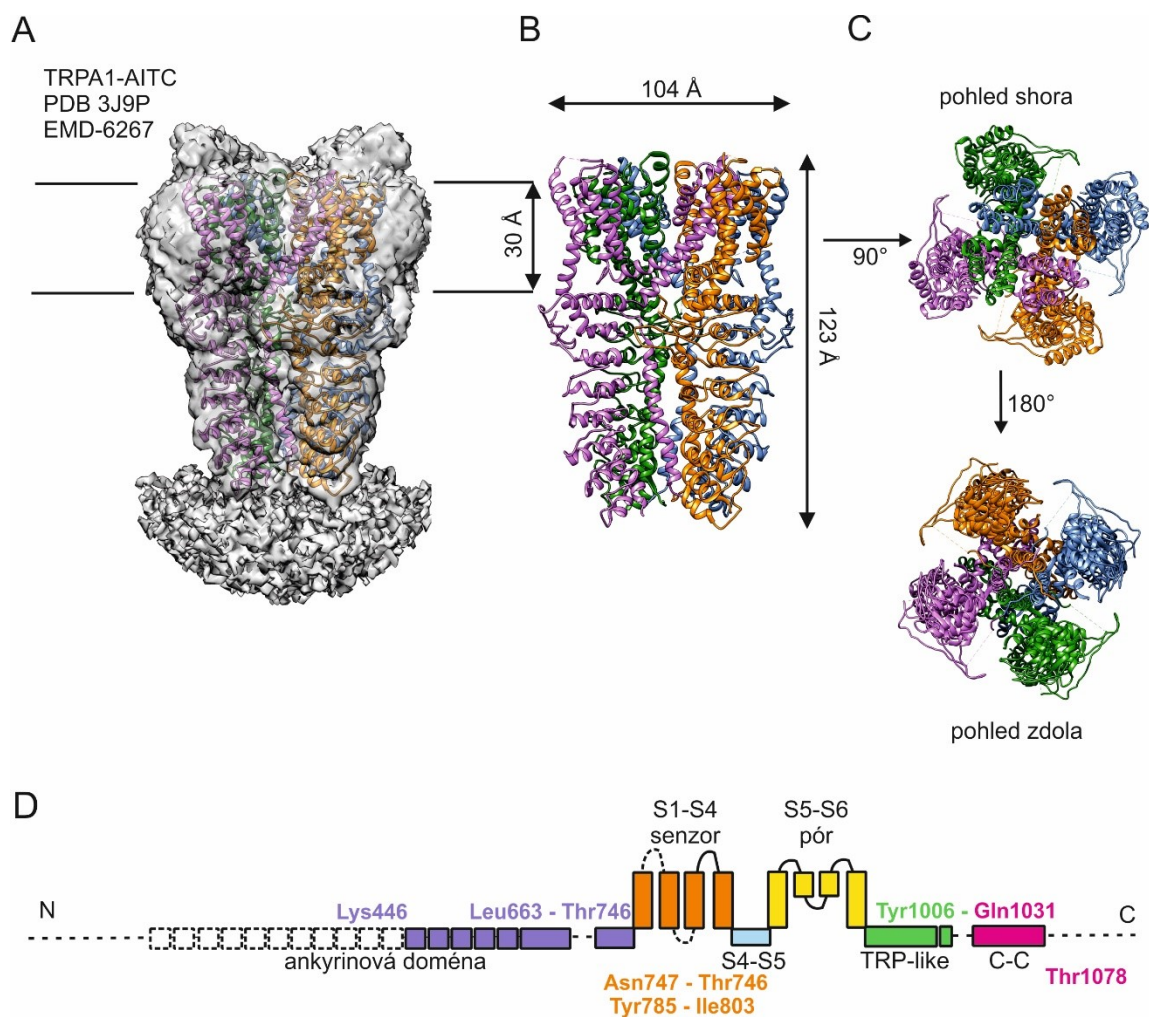
1.2 Struktura kanálu TRPA1

TRPA1 patří mezi transmembránové proteiny a je tvořen čtyřmi stejnými podjednotkami. Každá je tvořena z transmembránové části obsahující šest transmembránových helixů (S1-S6; S1-S4 – senzor, S5-S6 – pór) a z N- a C-konců exponovaných do cytoplazmy, které zahrnují přibližně 80 % aminokyselinové sekvence kanálu (viz Obrázek 2A-C, str. 14, a Obrázek 3, str. 16). Proteinová sekvence podjednotky lidského ortologu je tvořena 1119 aminokyselinami. První publikovaná struktura kanálu TRPA1 byla vyřešena pomocí kryoelektronové mikroskopie v roce 2015 [11]. Iontový kanál (PDB: 3J9P) je zachycen v zavřeném stavu v přítomnosti agonisty (allylisothiokyanát; AITC) a antagonistů (A-967079 a HC-030031) v nejlepším prostorovém rozlišení až 4,24 Å. Více než 50 % strukturního uspořádání kanálu se nepodařilo v této struktuře rozlišit, zejména některé flexibilní kličky a část mohutného N-konce tvořeného z charakteristických opakujících se sekvenčních motivů ankyrinových repetitiv (viz obrázek 2D, str. 14). Pro pochopení

strukturně-funkčních souvislostí v těchto pro funkci důležitých oblastech vznikaly struktury s doplněnými částmi pomocí počítačového modelování, například struktura s doplněnými kličkami mezi transmembránovými segmenty S1-S2 a S2-S3 byla publikována v roce 2018 (přístup na www.modelarchive.org, kód: ma-auqu1) [40, 41]. V roce 2019 se podařilo dvěma skupinám popsat dalších pět struktur lidského TRPA1 v různých konformačních stavech včetně plně otevřeného kanálu [42, 43]. Tyto nové struktury doplňují informace o některých dříve nerozlišených částech kanálu, způsobu otvírání kanálu a způsobu aktivace TRPA1 strukturně odlišnými elektrofilními agonisty.

První laboratoř publikovala tři nové TRPA1 struktury: bez přítomnosti ligandu (PDB: 6PQQ) a v přítomnosti ligandů 2-chloro-*N*-(4-(4menthoxyphenyl)thiazol-2-yl)-*N*-(3-methoxypropyl)-acetamidu (JT010, PDB: 6PQO) a benzyliothiokyanátu (BITC, PDB: 6PQP). Struktury v rozdílných konformačních stavech (otevřený/zavřený) dosahují strukturního rozlišení až 2,8 – 3,1 Å a odhalující určité části struktury a jejich funkce, které se do této doby pouze předpokládaly na základě různých experimentů (viz Obrázek 4, str. 18) [42]. Významným doplněním informace o struktuře je funkčně významné S1-S2 raménko s rozlišenou glykosylací na asparaginu 747, dále šest až sedm anulárních lipidů umístěných v prostoru mezi podjednotkami kanálu a rozlišen je také krátký helix (angl. interfacial helix, IFH) mezi podjednotkami v transmembránové oblasti, který pravděpodobně hraje významnou úlohu při otvírání a zavírání kanálu (viz Obrázek 4B-D, str. 18).

Dalšími publikovanými strukturami jsou TRPA1 v zavřeném stavu (komplex s inhibitorem A-967079, vazba do oblasti S5 helixu, PDB: 6V9W) a v plně otevřeném stavu v komplexu s ireverzibilním elektrofilním agonistou jodoacetamidem (IAA, vazba na Cys621 v pre-S1 oblasti) (PDB: 6V9V) [43]. Tyto struktury umožňují popsat způsob převodu signálu do oblasti póru vedoucí k jeho otevření. Významným objevem v souvislosti s těmito novými strukturami je odhalení přítomnosti iontu Ca^{2+} , který je klíčovou regulační molekulou TRPA1 (viz kapitola 1.3, str. 20) a je koordinován na spodní straně senzorové domény aminokyselinami (Glu788, Gln791, Asn805, Glu808) konzervovanými také napříč jinými podtypy TRP kanálů.



Obrázek 2: Struktura TRPA1. A) Receptor TRPA1 je tetramer složený ze čtyř stejných podjednotek. Rozlišení v přítomnosti agonisty AITC dosahuje až 4,24 Å (PDB: 3J9P, elektronová hustota EMD-6267) [11]. Vodorovné čáry naznačují buněčnou membránu. Elektronová hustota (šedá barva) nedosahovala ve všech částech dostatečného rozlišení pro odvození celé struktury – viz spodní část ve tvaru hříbu, jež představuje nerozlišený N-konec. B) Pohled na strukturu TRPA1 ze strany. C) Při pohledu na strukturu zespodu a shora lze vidět centrální pór kanálu v zavřeném stavu, který ve svém nejužším místě dosahuje šířky 6 Å. D) Schematické vyobrazení podjednotky TRPA1 (PDB: 3J9P) s vyznačenými rozlišenými částmi struktury. Z celkového počtu 1119 aminokyselin je rozlišená část Lys446-Thr1078, s výjimkou flexibilních ramének (přerušovaná čára značí nerozlišené oblasti). Barevným písmem jsou popsány aminokyseliny ohraničující nerozlišené části.

1.2.1 Transmembránová oblast

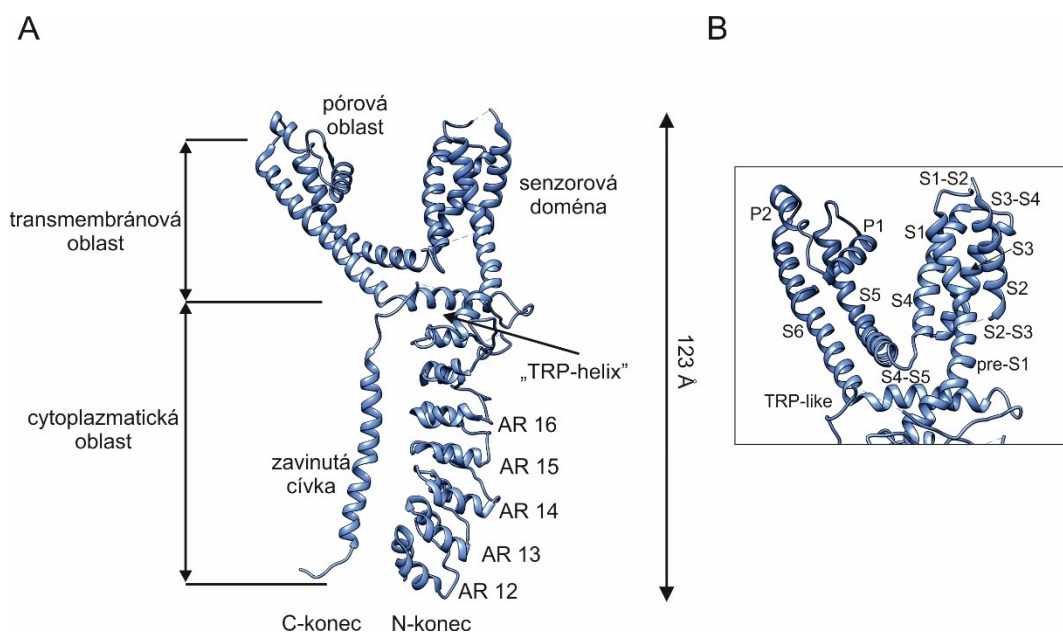
V oblasti membrány je podjednotka kanálu TRPA1 tvořena šesti helixy (S1 až S6), které jsou propojeny krátkými flexibilními raménky na intracelulární (S2-S3, S4-S5) a extracelulární (S1-S2, S3-S4) straně membrány (viz Obrázek 3B, str. 16). Evolučně konzervované helixy S5 a S6 tvoří v kontaktu s okolními podjednotkami pór kanálu a navzájem jsou propojeny dvěma krátkými pórovými helixy. V rámci póru se vyskytují specifické aminokyselinové zbytky tvořící vrátka kanálu: horní vrátka tvořená Asp915

a dolní vrátka tvořená dvojicí hydrofobních zbytků Ile957 a Val961. Transmembránové helixy S1 až S4 vytváří senzorovou doménu, která je evolučně mladší a slouží pro regulaci aktivity kanálu a k převodu signálů z periferních oblastí proteinu do oblasti póru [44]. Prvnímu transmembránovému helixu S1 předchází funkčně významná oblast (tzv. pre-S1), kterou tvoří pre-S1 helix a raménko tvořené dvěma antiparalelními β -listy, jež jsou v kontaktu s dalším β -listem z C-konce proteinu. S touto oblastí je ve spojení také α -helix označovaný jako „TRP-like“ helix, který je orientovaný paralelně s intracelulární stranou plazmatické membrány a bezprostředně navazuje na poslední transmembránový helix S6. Jedná se o strukturu analogickou k TRP-helixu konzervovanému napříč všemi TRP kanály, která u TRPA1 nebyla původně predikována na základě sekvenční homologie. V původní struktuře (PDB: 3J9P) se v blízkosti pre-S1 oblasti vyskytuje nerozlišené flexibilní raménko z proximálního C-konce [11]. Nové struktury z roku 2019 odhalují a potvrzují v rámci tohoto raménka krátký IFH helix, jehož existence a souvislost s regulací funkce TRPA1 lipidy a zinečnatými ionty byla již dříve funkčně prokázána [38, 41, 42, 45, 46]. Tato strukturně důležitá oblast se uplatňuje v převodu signálů z různých částí kanálu do vrátkovací oblasti, ať už se jedná o aktivaci agonisty či změnami teploty [38, 45].

Jeden z článků o nových strukturách TRPA1 také přináší významné informace o mechanismu otvírání kanálu na základě změny mezi zavřenou strukturou (v interakci s antagonistou A-967079) a otevřenou strukturou (v interakci s IAA) [43]. Při přechodu do otevřeného stavu rotuje celá transmembránová část přibližně o 15° a změny v transmembránovém helixu S5 a S6 vedou k rozšíření vrátek póru. Raménko S4-S5 se stává součástí helixu S5, helix S6 se posune směrem nahoru, což vyvolá posun také pórových helixů P1 a P2 a tyto změny souhrnně vedou k rozšíření horních vrátek (Gly914, Asp915) z 8,5 na 9,7 Å a spodních vrátek (Ile957, Val961) z 5,3 na 7,8 Å. Vzhledem k tomu, že k otevření dochází po navázání elektrofilního agonisty do reakční kapsy umístěné pod transmembránovou doménou, uvažuje se o možném alosterickém účinku aktivace a celá strukturní oblast vazby elektrofilních aktivátorů je označována jako tzv. „alosterický nexus“. Strukturně vysvětlen je také mechanismus inhibice antagonisty A-967079, který se váže do oblasti pod pórovými helixy u ohybu na S5 helixu [11], jenž je při otevření narovnáán, a tímto vazba antagonisty zabraňuje konformačním změnám vedoucím k otevření kanálu.

V transmembránové oblasti je popsáno značné množství regulačních míst [47]. V oblasti póru se vyskytují místa účinku specifických antagonistů, např. A-967079 a HC-

030031 (Met911 a Met912). Valin 875 na S5 helixu je místem účinku neelektrofilního agonisty mentholu a významně se podílí také na teplotní citlivosti kanálu [34, 48]. Pátý transmembránový helix je kromě mentholu místem účinku dalších monoterpenů např. karvakrolu a thymolu [49]. Na S4-S5 raménku lidského TRPA1 se vyskytuje významné místo jednonukleotidového polymorfismu, v němž záměna asparaginu 855 za serin vyvolává onemocnění zvané familiální epizodická bolest [27]. Raménko S1-S2 směřující na vnější stranu membrány obsahuje glykosylaci a je místem účinku pavoučího pro-toxinu 1 [50]. Z hlediska aktivace a modulace kanálu je důležitá interakce s membránovými lipidy, která byla v průběhu let intenzivně studována (viz přehledné články [51-53]). Nová struktura TRPA1 odhaluje IFH jako oblast interakce s membránovými lipidy, která je zrušena aktivací kanálu reverzibilním elektrofilním agonistou, a umožňuje tak otevření kanálu [42]. Již dříve byly v oblasti sensorové vazebné dutiny charakterizovány aminokyselinové zbytky (His719, Asn722, Lys787, Lys796, Arg852, Lys989) interagující s fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP₂) a v nedávné době byl také určen His1018 z oblasti IFH jako možná interagující aminokyselina s membránovými lipidy [41, 54].



Obrázek 3: Schéma podjednotky kanálu TRPA1 podle PDB: 3J9P z roku 2015. A) Podjednotka kanálu TRPA1 je tvořena z membránové části a cytoplazmatického N- a C-konce. Membránová část obsahuje sensorovou doménu a pórovou oblast. N-konec obsahuje 16 ankyrinových repetic (AR), přičemž rozlišená struktura začíná dvanáctou ankyrinovou repeticí. Cytoplazmatický C-konec vytváří strukturu tzv. zavinuté cívky a následuje jej krátký „TRP-like“ helix významný z hlediska převodu signálů do pórové oblasti. B) Detail transmembránové oblasti. Sensorová doména je tvořena helixy S1-S4, které jsou na vnějších stranách membrány spojeny krátkými flexibilními kličkami (S1-S2, S2-S3, S3-S4). Pomocí dalšího krátkého raménka S4-S5 je sensorová doména spojena s centrálními helixy S5 a S6, které vytváří v kontaktu s ostatními podjednotkami pór kanálu, a jež jsou rozděleny pórovými helixy P1 a P2. Vytvořeno v programu Chimera 1.14.

1.2.2 Cytoplazmatický N-konec

N-konec receptoru TRPA1 zahrnuje 16 ankyrinových repetitiv vytvářejících ankyrinovou doménu (angl. ankyrin repeat domain, ARD), která je typická pro většinu TRP kanálů. Ankyrinový podtyp TRP kanálů obsahuje vysoké množství ankyrinových repetitiv, čemuž odpovídá i dominantní velikost cytoplazmatické N-koncové části kanálu (viz Obrázek 2A a B, str. 14). Ankyrinová repetice (AR) je častý strukturní motiv tvořený obvykle 33 aminokyselinovými zbytky, který je uspořádán jako antiparalelní helix-otáčka-helix struktura následovaná β -vlásečkou. Pět ze 16 AR lidského TRPA1 obsahuje konsenzuální tetrapeptidový motiv T/SPLH, v němž prolin je na začátku prvního α -helixu, zatímco threonin a histidin vytvářejí vazby v rámci helixu i mezi oběma helixy, a tím přispívají k typické konformační stabilitě ankyrinové repetice v rámci blízkého okolí (viz Obrázek 3A, str. 16). Sousedící ankyrinové repetice jsou vzájemně uspořádány do protáhlé domény (ARD), která je charakteristickým místem protein-proteinových interakcí [55]. V případě lidského TRPA1 jsou ARD navíc místem vazby mnoha neproteinových ligandů.

U lidského TRPA1 je strukturně rozlišena pouze druhá polovina struktury (aminokyseliny Lys446-Thr1078 z celkového rozsahu 1119 aminokyselin s výjimkou několika flexibilních ramének) a začíná dvanáctou ARD z celkových šestnácti (viz Obrázek 3A, str. 16). Tato část ARD je v těsném spojení s C-koncem a tím je zajištěna stabilita celé struktury [11]. Nerozlišená část N-konce je viditelná na mapě elektronové hustoty jako symetrický půlměsíc rozprostírající se pod strukturou a obracející se směrem k vnitřní části membrány (viz Obrázek 2A, str. 14).

Aktivace elektrofilními činidly je uskutečněna pomocí kovalentní modifikace cysteinů, přičemž stále více studií identifikuje Cys621 jako hlavní místo zodpovědné za citlivost kanálu TRPA1 k elektrofilním agonistům – například nové struktury z roku 2020 jsou charakterizovány v přítomnosti reverzibilně vázajícího se agonisty benzyliothiokyanátu (BITC) a ireverzibilně se vázajícího agonisty JT010, které umožňují detailnější popis elektrofilní aktivace (viz Obrázek 4, str. 18) [42, 56-58].

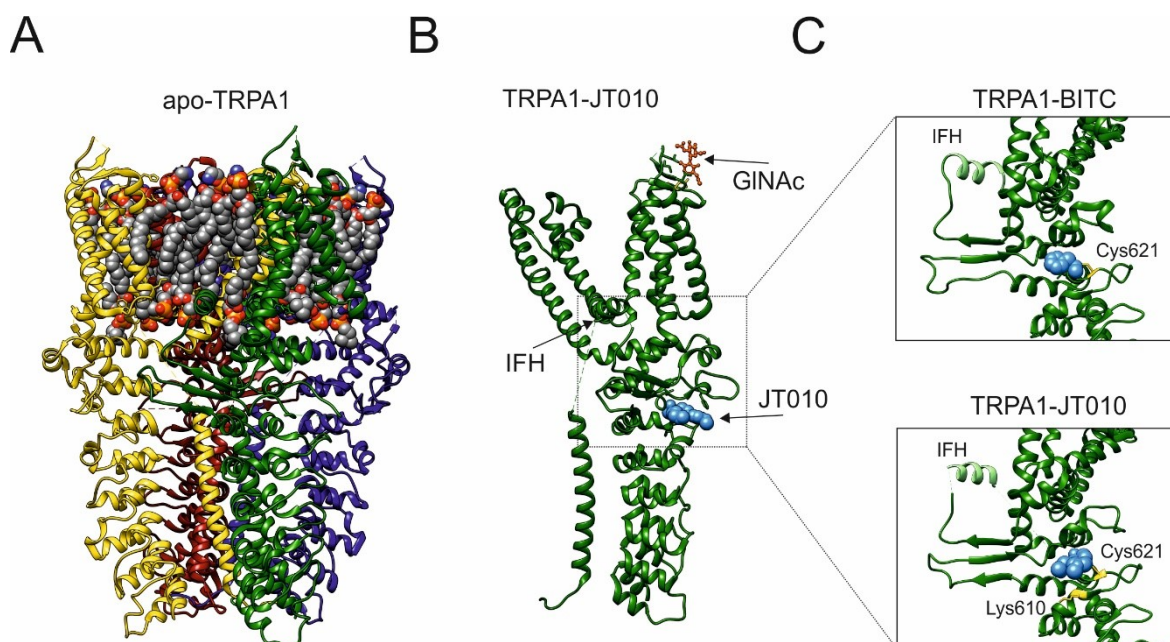
1.2.3 Cytoplazmatický C-konec

V kontaktu s prostorově objemnou ARD na N-konci kanálu TRPA1 je v cytoplazmatické části centrálně lokalizovaný C-konec ve formě tzv. zavinuté cívky (angl. coiled coil, viz Obrázek 3A, str. 16) [11]. Čtyři dlouhé α -helixy (jeden z každé podjednotky kanálu) zprostředkovávají vzájemný kontakt podjednotek. Ke stabilizaci struktury v těchto místech

může přispívat také interakce s polyfosfáty, konkrétně inositol hexakisfosfátem, jehož molekula byla rozlišena v původním PDB souboru 3J9P z roku 2015. Přítomnost inositol hexakisfosfátu však zřejmě není pro stabilizaci proteinového komplexu nutná vzhledem k tomu, že nebyl nalezen v žádné z později publikovaných struktur.

Zavinuté cívice předchází v oblasti membrány flexibilní raménko (viz kapitola 1.2.1, str. 14), které umožňuje kontakt C-konce jak s transmembránovou částí, tak s pre-S1 částí, čímž se tato oblast (spolu s „TRP-like“ helixem) stává důležitým alosterickým místem z hlediska převodu signálů ze všech tří dříve zmíněných částí kanálu do oblasti póru.

V distální části C-konce se nacházejí kyselé aminokyselinové zbytky Glu1073, Glu1077 a Asp1080-Asp1082, které zprostředkovávají vazbu vápenatých iontů, a tak regulují aktivitu kanálu mechanismem přímé vazby či interakcí přes protein kalmodulin (CaM) [59, 60].



Obrázek 4: Nové kryoelektronové struktury TRPA1 [42]. A) V elektronových hustotách struktur z roku 2020 byly rozlišeny anulární lipidy okolní membránové dvojvrstvy (oranžová a šedá) – na obrázku apo-TRPA1 (PDB: 6PQQ). B) Podjednotka struktury TRPA1-JT010 (PDB: 6PQQ). Modře je vyobrazena molekula elektrofilního agonisty JT010. Poprvé byla strukturně potvrzena N-glykosylace na Asn747 (dvě molekuly N-acetylglukosaminu, GlnAc). V oblasti C-konce byl rozlišen krátký α -helix (angl. interfacial helix, IFH), který je důležitým místem interakce s membránovými lipidy. C) Pohled na tzv. reakční kapsu, ve které dochází k aktivaci TRPA1 elektrofilními látkami (modrá). Při elektrofilní aktivaci je kovalentně modifikován Cys621 (žlutá). Lys610 (žlutá) přispívá k převodu signálu přes „TRP-like“ helix do vrátek kanálu. Vytvořeno v programu Chimera 1.14.

1.2.4 Strukturní modelování TRPA1

První molekulární struktura lidského TRPA1 byla publikována v roce 2011 na základě získaných dat elektronové kryomikroskopie s rozlišením příliš nízkým (16 Å) pro účely molekulárního modelování [61]. Strukturně-funkční studie využívaly metody homologního modelování pro transmembránovou oblast kanálu, která vykazuje 10% sekvenční identitu s kanálem pro draselné ionty Kv1.2 (PDB: 3LUT [62]) [48, 63, 64]. Cílem jedné ze studií bylo popsat možné strukturní důsledky nukleotidového polymorfismu N855S [63]. Pro vytvoření homologního modelu transmembránové oblasti autoři využili krystalovou strukturu Kv1.2, N-konec doplnili modelem vytvořeným na základě kombinace dvou struktur lidského ankyrinu (PDB: 1N11; 25% sekvenční identita [65]), přičemž model oblasti vazby Ca^{2+} (EF-hand) byl upřesněn pomocí struktury PDB: 1XK4 [66]. Na základě homologního modelu založeném na krystalové struktuře pórové oblasti draselného kanálu KcsA (PDB: 1BL8 [67]) bylo modelováno působení mentholu na myši TRPA1 v oblasti membránového helixu S5 [48].

Kryoelektronová struktura publikovaná v roce 2015 v rozlišení ~ 4 Å (PDB 3J9P [11]) umožnila přesnější interpretaci dříve publikovaných experimentálních dat a stala se podkladem řady následných studií. Avšak i v této struktuře chybí části významných oblastí, ať už se jedná o flexibilní kličky či o mohutný ankyrinový N-konec (viz Obrázek 2D, str. 14). Navíc struktura zachycuje iontový kanál v zavřeném stavu, a tak neumožňuje popsat pravděpodobný mechanismus vrátkování. Pro tyto účely byla v jedné studii využita struktura příbuzného vaniloidního kanálu TRPV1 v otevřeném stavu (PDB: 3J5Q [40]). Funkčně významné nerozlišené kličky (S1-S2, S2-S3 a část cytoplazmatického C-konce) byly modelovány *ab initio* pomocí programu Swiss-Model a následně pomocí molekulárně dynamického flexibilního „fitování“ (angl. molecular dynamics flexible fitting, MDFF) byly vloženy optimalizované strukturní části do místa původní elektronové hustoty s co nejvyšší mírou shody [38, 40].

V případě proximální části cytoplazmatického C-konce byla v původní struktuře 3J9P pozorována část elektronové hustoty, ve které byl v oblasti rozhraní mezi podjednotkami predikován krátký α -helix. Bylo zřejmé, že tato část struktury je flexibilní a může ovlivňovat významným způsobem vrátkování kanálu prostřednictvím přímé interakce s membránovými helixy S1, S5, pre-S1 oblastí, „TRP-like“ helixem a okolními membránovými lipidy. Předpokládalo se, že tento predikovaný α -helix, později potvrzený jako IFH (viz Obrázek 4B, str. 18), může převádět konformační změny

vzdálených oblastí kanálu do póru. V rámci tohoto proximálního C-konce byla experimentálně potvrzena interakce s PIP₂ [45] a později byl v rámci predikovaného IFH helixu charakterizován His1018, který pravděpodobně v této interakci hraje významnou úlohu [54]. Tuto skutečnost potvrzuje modelování elektrostatického potenciálu v oblasti s mutací H1018R, která způsobuje zvětšení kladného potenciálu, a tím zvýšení pravděpodobnosti vazby fosfolipidu. Struktury publikované ve zcela nedávné době (PDB: 6PQQ, 6PQP, 6PQO) potvrzují původní predikce a prokazují, že krátký helix (IFH, viz Obrázek 4B a C, str. 18) je důležitým místem alosterické regulace receptoru [42]. Proximální část C-konce (Leu992-Asn1008), která předchází IFH, interaguje také s komplexem CaM/Ca²⁺ [59]. Protein CaM může kromě toho interagovat s jinými vazebnými proteiny, a tak ovlivňovat následně aktivitu kanálu TRPA1.

1.3 Aktivátory TRPA1

Skupina látek, které modulují aktivitu TRPA1, je velmi početná a strukturně různorodá [68]. Iontový kanál je aktivován rozsáhlou škálou podnětů a chemických látek, často obsažených v rostlinných olejích, které prostřednictvím aktivace nociceptivních neuronů vyvolávají palčivý či bolestivý vjem. Mezi aktivátory TRPA1 se řadí široké spektrum elektrofilních ale i neelektrofilních látek, reaktivní sloučeniny kyslíku (angl. reactive oxygen species, ROS), dvojmocné kationty, extrémní teplo/chlad, či mechanická aktivace. TRPA1 je také modulován zánětlivými mediátory (např. bradykinin, histamin, nervový růstový faktor) a jeho aktivace vyvolává řadu příznaků, mezi které se řadí hyperalgesie, alodynie (chladová, mechanická) či svědění. Podrobný popis všech známých aktivátorů TRPA1 a mechanismů jejich účinků lze nalézt v přehledných člancích [68-70].

Fyziologicky významným aktivátorem TRPA1 jsou vápenaté ionty, které mají bimodální účinek: aktivují kanál při nízkých koncentracích, a naopak jej inaktivují při koncentracích vyšších [59]. Vápenaté ionty aktivují kanál přímo nebo vazbou na CaM, existuje několik predikovaných a experimentálně prokázaných míst těchto interakcí. Původní studie určila predikovaný EF-hand (kanonický helix-otočka-helix motiv jako vazebné místo vápenatých kationtů [71]) v oblasti N-koncové části [37], avšak tato informace byla následně zpochybňována [72]. Nová struktura z roku 2020 odhalila v elektronové hustotě koordinovaně vázaný vápenatý kation, na jehož vazbě se podílí aminokyselinové zbytky Glu788, Gln791, Asn805 a Glu808. Mutace E788S zcela

odstranila modulační účinek Ca^{2+} . Nově publikovaná struktura otevřeného kanálu také potvrdila významnou úlohu Asp915 jako selektivního filtru, který se v otevřeném stavu reorientuje směrem do extracelulárního prostoru a v ústí póru se zpřístupňují kyselé rezidua, která atrahují kladně nabitě ionty včetně Ca^{2+} [43]. Významnou úlohu v modulaci TRPA1 vápenatými ionty hraje také modulace aktivity kanálu kalmodulinem, který se váže na jeho proximální část C-konce, a tím moduluje aktivitu kanálu (viz kapitola 1.2.4, str. 19). Funkčně významný účinek byl prokázán pro vazbu C-konce CaM, přičemž N-konec CaM je zřejmě přístupný pro vazbu jiných proteinů [59], nebo pro interakci s N-koncem TRPA1 [54].

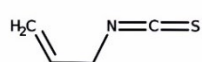
1.3.1 Elektrofilní aktivátory

Kanál TRPA1 je aktivován rozsáhlou škálou strukturně nepodobných elektrofilních látek (včetně některých dráždivých látek způsobujících palčivé, svědivé či bolestivé reakce), které mají společný mechanismus účinku pomocí kovalentní modifikace cysteinových reziduí na N-konci kanálu TRPA1 (viz Obrázek 5A, str. 22). Mezi ně patří například allylisothiokyanát (AITC) obsažený ve wasabi, allicin, který je součástí česnekové esence, skořicový aldehyd, jodoacetamid (IAA), akrolein, či řada zánětlivých mediátorů (oxid dusný, peroxid vodíku, 15-deoxy- $\Delta 12,14$ -prostaglandin J2) [2, 25, 35, 57, 58, 73-77]. V původních studiích byly určeny cysteiny 621, 641 a 665 jako klíčové pro elektrofilní aktivaci [57]. Elektrofilní aktivace může být reverzibilní, například v případě allylisothiokyanátu, nebo ireverzibilní v případě *N*-methylmaleimidu. Cysteiny podléhají třem typům reakce: Michaelova adice na α,β -nenasycenou vazbu aldehydů (skořicový aldehyd – viz Obrázek 5B, str. 22, akrolein – viz Obrázek 5A, str. 22), $\text{S}_{\text{N}}2$ nukleofilní substituce (jodoacetamid) a tvorba disulfidických můstků [57, 58].

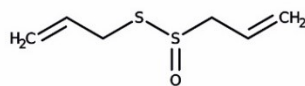
Nová struktura lidského TRPA1 v otevřeném stavu z roku 2020 umožnila strukturní popis mechanismu elektrofilní aktivace a jednoznačně určila klíčovou úlohu Cys621 jako hlavního zprostředkovatele této reakce (viz Obrázek 4B a C, str. 18) [43]. Všechna tři výše uvedená cysteinová rezidua jsou strukturně umístěna v reakční dutině, jejíž součástí je tzv. aktivační smyčka (angl. activation loop, A-loop), která zaujímá dva konformační stavy „up“ (po navázání elektrofilu) a „down“ (před navázáním elektrofilu). Elektrofilní reakce se zdá být dvoukroková. Prvním krokem je interakce s Cys621, což umožňuje reorientaci aktivační smyčky a odhalení Cys665. V případě malých elektrofilů (IAA) je Cys665 také částečně modifikován a umožňuje plnou aktivaci a převod signálu do dolních vrátek přes

konformační změny v „TRP-like“ helixu a v konečném důsledku S6 helixu pórové domény. Většímu analogu IAA (BODIPY-IA, viz Obrázek 5, str. 22) k plnohodnotné aktivaci stačí vazba na Cys621.

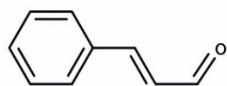
A



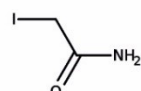
allylisothiokyanát



allicin



skořicový aldehyd

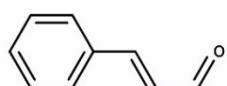


jodoacetamid

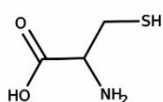


akrolein

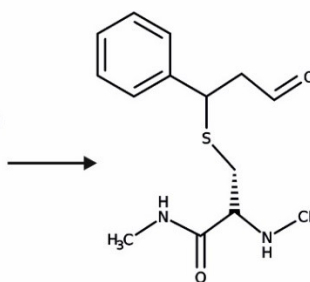
B



skořicový aldehyd

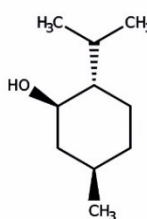


cystein

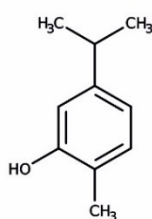


produkt Michaelovy adice

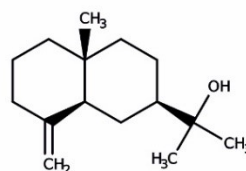
C



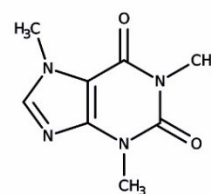
menthol



karvakrol

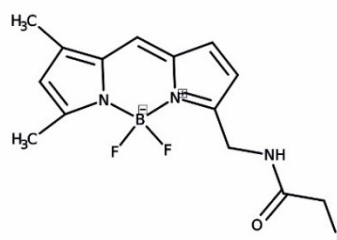


β-eudesmol



kofein

D



BODIPY-jodoacetamid

Obrázek 5: Aktivátory TRPA1. A) Zástupci elektrofilních agonistů receptoru TRPA1 vyvolávajících palčivý pocit. Elektrofilní látky ovlivňují funkci TRPA1 prostřednictvím kovalentní modifikace Cys621. B) Jeden ze způsobů kovalentní modifikace cysteinů TRPA1 elektrofilními činidly – Michaelova adice na α,β -nenasycenou vazbu skořicového aldehydu. C) Zástupci neelektrofilních agonistů receptoru TRPA1, kteří působí na TRPA1 především v transmembránové oblasti receptoru. D) Struktura většího analogu jodoacetamidu – BODIPY-IA. Vytvořeno pomocí programu MarvinSketch.

1.3.2 Neelektrofilní aktivátory

Molekulární mechanismus aktivace TRPA1 neelektrofilními agonisty není v současné době detailně popsán, nicméně experimentální data svědčí o klasické vazbě na specifické vazebné místo ve struktuře kanálu [48]. Neelektrofilní aktivátory TRPA1 jsou látky strukturně různorodé a aktivaci či deaktivaci vyvolávají vazbou převážně v místech transmembránové oblasti [48].

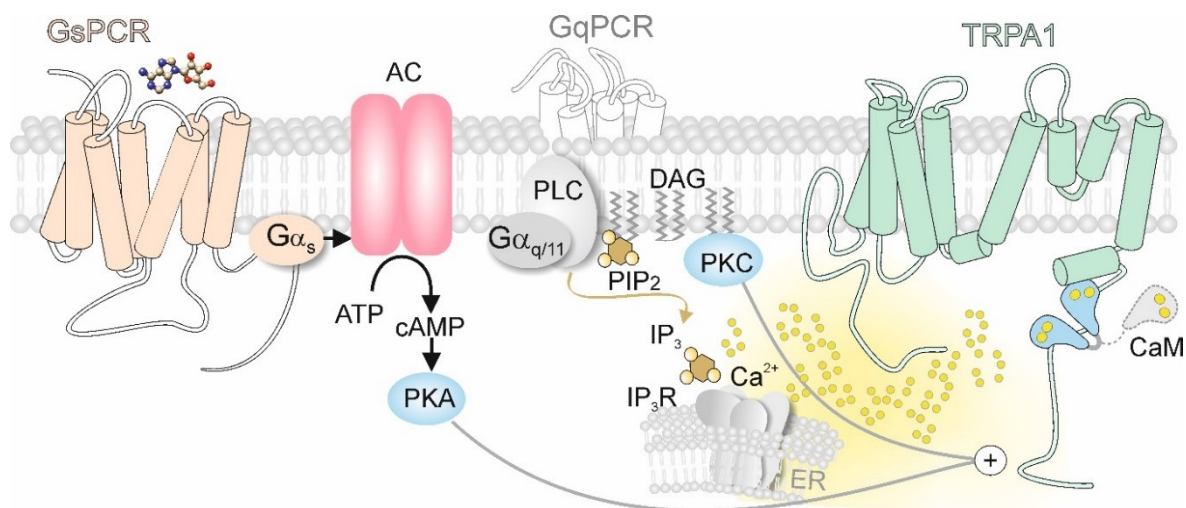
Typickým zástupcem neelektrofilních aktivátorů je menthol, který svým působením vyvolává chladivé pocity [48]. Menthol je aktivátorem také příbuzného TRPM8 kanálu, který je považován za chladový senzor [78]. U TRPA1 vykazuje menthol (podobně jako Ca^{2+}) bimodální charakter, aktivuje kanál nízkými koncentracemi a inhibuje koncentracemi vyššími [79]. Za vazbu mentholu na TRPA1 je zodpovědný aminokyselinový zbytek Val875, který je součástí transmembránového helixu S5 [48].

Mezi aktivátory receptoru TRPA1 patří také různé terpenoidní látky, mj. karvakrol udávající palčivou chuť hluchavkovité rostlině dobromysli známé také jako oregano [80], nikotin vykazující bimodální aktivitu [81], či eudesmol obsažený v chmelových silicích, jehož místem účinku je Ser873 na transmembránovém helixu S5 [82]. Zajímavý účinek má také kofein, který aktivuje myši TRPA1, avšak potlačuje aktivitu lidského ortologu [83].

1.4 Regulace TRPA1 signalizačními drahami

Na základě analogie s jinými receptory účastnicími se převodu nociceptivních podnětů se všeobecně předpokládá, že jedním z hlavních regulačních mechanismů aktivity TRPA1 v nativním prostředí je fosforylace. Lze předpokládat, že potenciální fosforylační místa, která se uplatňují za některých patofyziologických podmínek, by mohla představovat důležitý cíl látek s analgetickým působením. Na rozdíl od vysoce selektivních kompetitivních a nekompetitivních antagonistů by látky, které cílí na místa posttranslační modifikace, nevyřadily nezbytnou fyziologickou funkci transdukčních iontových kanálů, jež plní ochrannou úlohu v normální nociceptivní signalizaci. TRPA1 je regulován některými receptory spřaženými s G proteiny (angl. G-protein coupled receptors, GPCR). Jednou z důležitých drah, která vede k fosforylaci TRPA1, je fosforylační dráha indukovaná bradykininem, což je zánětlivý mediátor uplatňující se při vzniku pocitů bolesti [84]. Modulace aktivity TRPA1 je zřejmě zprostředkována oběma typy bradykininových receptorů – B1 a B2, přičemž při zánětlivých stavech se uplatňuje

receptor B2. Po navázání bradykininu na B2 receptor mohou být spuštěny dvě fosforylační kaskády: jedna cesta aktivuje fosfolipasu C (PLC) přes $G_{\alpha q}$ protein [85], druhá cesta vede k aktivaci proteinkinasy A (PKA) přes $G_{\alpha s}$ protein (viz Obrázek 6, str. 24) [86]. Fosfolipasa C štěpí membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na diacylglycerol (DAG), který aktivuje proteinkinasu C (PKC), a na inositoltrifosfát (IP_3), jenž se váže na receptory IP_3R v membráně endoplazmatického retikula, což vede ke zvýšení cytoplazmatické koncentrace Ca^{2+} . Druhá signalizační cesta prostřednictvím $G_{\alpha s}$ aktivuje adenylátcyklasu, která vytváří cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), což je významná regulační molekula, která aktivuje PKA. TRPA1 je jedním z efektorů těchto signalizačních drah, přičemž jeho aktivita je kromě fosforylace regulována také produkty těchto signálních drah – vápenatými ionty a membránovými fosfolipidy [45, 59].



Obrázek 6: Regulace TRPA1 signalizačními drahami. TRPA1 podléhá fosforylaci v důsledku aktivace signalizačních drah začínajících na úrovni receptorů spážených s G-proteiny. Dráha $G_{\alpha s}$ aktivuje adenylátcyklasu (AC, červená) produkující molekulu cAMP, která aktivuje proteinkinasu A (PKA). Druhá dráha spážená s $G_{\alpha q}$ proteinem aktivuje fosfolipasu C (PLC), která štěpí membránový fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát (IP_3). DAG aktivuje proteinkinasu C a inositoltrifosfát se váže na své receptory (IP_3R) na membráně endoplazmatického retikula (ER), ze kterého jsou vylévány do cytoplazmy vápenaté kationty. Kiny PKA a PKC (světle modrá) pak fosforylují receptor TRPA1 (světle zelená). Vápenaté kationty mohou ovlivňovat aktivitu TRPA1 přímo nebo skrze kalmodulin (CaM).

Mechanismy fosforylace TRPA1 na molekulární úrovni nejsou zatím dostatečně prozkoumány. Důvodem jsou především do nedávné doby chybějící strukturní informace o různých konformačních stavech kanálu a nedostatečná specifita protilátek proti TRPA1. Přestože existuje množství sofistikovaných programů, kterými lze na základě primární struktury určit pravděpodobnost a specifitu potenciálních fosforylačních míst, posouzení informace o terciární a kvartérní struktuře proteinu a kontextu jeho exprese v nativních

tkáních jsou zcela nezbytné. Z obecného hlediska konzervovanosti sekvence daného proteinu v oblastech potenciálních fosforylačních míst zatím také existují jen více nebo méně rozsáhlé bioinformatické studie [87, 88].

1.5 Proteiny interagující s TRPA1

1.5.1 Interakce TRPA1 s TRPV1

Různé typy TRP kanálů jsou v nativních podmínkách často exprimovány společně, mohou vytvářet heteromery a vzájemně regulovat svou aktivitu. Například TRPA1, TRPM3 a TRPV1 v periferních senzoričských neuronech společně zajišťují odpověď na bolestivé teplo u myši [30]. Dalším příkladem současné exprese v určitých podtypech senzoričských neuronů jsou TRPA1 a TRPV1, které zprostředkovávají nociceptivní odpověď za patofyziologických podmínek [1]. Ačkoli mechanismus jejich vzájemné regulace na molekulární úrovni není detailně objasněn [2, 89, 90], oba kanály jsou regulovány intracelulárními i extracelulárními vápenatými kationty, které přímou interakcí nebo nepřímo, závisle na aktivitě kanálů, následně modulují jejich aktivitu [91]. Kromě TRPV1 jsou dalšími funkčně významnými proteiny prokazatelně interagujícími s TRPA1 transmembránový protein Tmem100 [92], CaM, který může zprostředkovat citlivost receptoru na přítomné vápenaté ionty [59], a zakotvující protein pro proteinkinasy (angl. A-kinase anchoring protein, AKAP79/150) (viz Obrázek 7, str. 27) [93]. V neuronech může být vliv TRPV1 na aktivitu receptoru TRPA1 důsledkem vazby Tmem100 na oba receptory [92], nebo přímé interakce TRPA1 s N-koncem (aminokyseliny 220-260; překryv s CaM vazebným místem: 189-222 [94]) a C-koncem (684-720; shoda s vazebným místem pro PIP₂ [95]) TRPV1 receptoru [89]. Určení souvislostí mezi jednotlivými klíčovými proteiny je důležité především z hlediska určení možných klinických cílů pro léčbu chronické bolesti [89].

1.5.2 Interakce TRPA1 s AKAP79/150

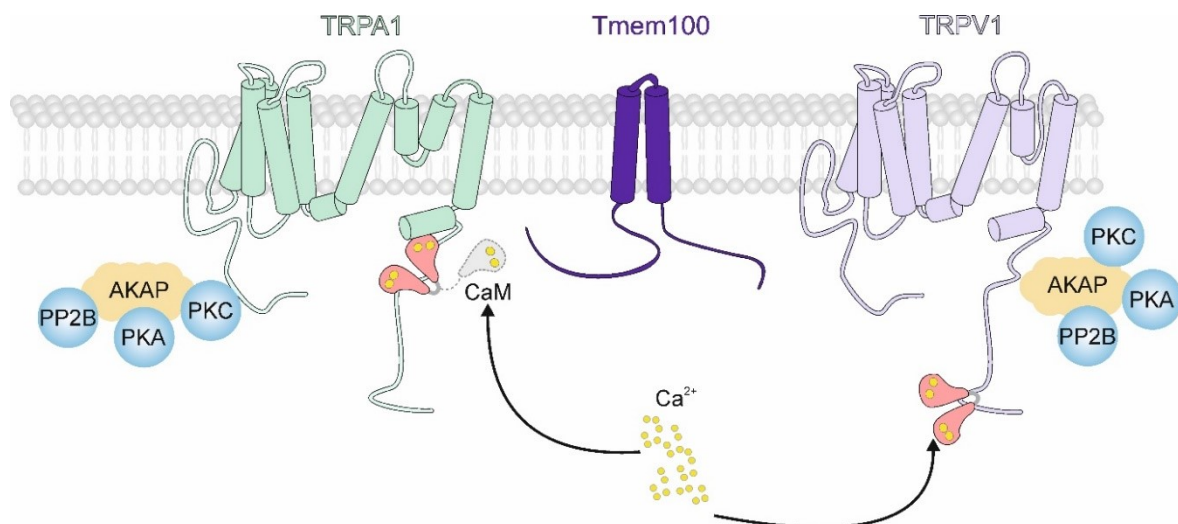
V senzoričských neuronech interaguje TRPA1 s proteinem AKAP79/150 (AKAP, A-kinase anchoring protein; lidská izoforma 79 kDa, myší izoforma 150 kDa) [93]. Tento protein zakotvuje proteinkinasy A (PKA), proteinkinasy C (PKC) a fosfatasy 2B, kalcineurin, v blízkosti mnoha membránových receptorů a umožňuje tak jejich lokální účinnou regulaci prostřednictvím fosforylace a defosforylace (viz Obrázek 6, str. 24) [96].

V případě TRPA1 a TRPV1 zodpovídá mechanismus fosforylace za některé patofyziologické stavy, jakými jsou zánět nebo bolest [84, 97]. Bylo například prokázáno, že AKAP79/150 napomáhá přesunu TRPV1 do plazmatické membrány a zvyšuje jeho bazální fosforylaci, při defosforylaci kalcineurinem se však neuplatňuje [98]. Naproti tomu molekulární mechanismy interakce AKAP79/150 s TRPA1 jsou zatím jen velmi málo prozkoumány.

V roce 2017 bylo prokázáno, že přítomnost AKAP79/150 je nezbytná pro fosforylaci TRPA1 v periferních senzoryckých neuronech [93]. Konkrétně v signalizační dráze začínající na úrovni glutamátového metabotropního receptoru mGluR5, subtyp 1. Tyto receptory jsou aktivovány zánětlivým mediátorem glutamátem a jsou spřaženy s $G_{\alpha q/11}$ proteiny, které aktivují enzymy fosfolipasu C a proteinkinasu A (viz kapitola 1.4, str. 23), které jsou pomocí AKAP79/150 ukotveny v blízkosti cílového substrátu TRPA1. Fosforylace TRPA1 snižuje práh pro aktivaci kanálu a v konečném důsledku zvyšuje nociceptivní odpověď. Z výsledků uvedené studie vyplývá, že fosforylace TRPA1 přispívá k experimentálně navozené persistentní mechanické hyperalgesii.

Důležitost interakce TRPA1 a AKAP79/150 proteinu dokládá nedávná studie o protinádorovém léčivu karboplatině, který jako vedlejší účinek vyvolává periferní neuropatii (bolest z důsledku poškození periferní či centrální nervové soustavy) [99]. Typickými příznaky periferní neuropatie a také patologické aktivity TRPA1 je mechanická alodynie či chladová hyperalgesie. Tyto projevy se podařilo zablokovat nejen působením TRPA1 antagonistů, ale také inhibicí interakce mezi RII podjednotkou PKA a AKAP79/150. Karboplatina zvyšuje množství cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňce, a tím aktivuje proteinkinasu A, která fosforyluje TRPA1 a snižuje tak práh jeho aktivace. Pro fosforylaci PKA je opět nutná přítomnost AKAP79/150 proteinu.

AKAP79/150 interaguje také s kalmodulinem s navázanými Ca^{2+} , přičemž vazba komplexu CaM/Ca^{2+} umožňuje odkrytí místa pro vazbu kalcineurinu [100]. Delece CaM/Ca^{2+} vazebného místa pak způsobuje vyšší míru fosforylace TRPA1 prostřednictvím PKA.



Obrázek 7: Proteiny interagující s TRPA1. TRPA1 je v některých nervových typech exprimován společně s příbuzným vaniloidním TRP kanálem TRPV1 a společně zprostředkovávají odpověď za patofyziologických podmínek. Tuto interakci může v neuronech ovlivňovat vazba Tmem100 na oba receptory. Společným interakčním partnerem pro oba kanály jsou také vápenaté kationty, které ovlivňují kanál přímo, nebo prostřednictvím vazby na kalmodulin (CaM). Pro TRPA1 a TRPV1 kanály je dokázána interakce se zakotvujícím proteinem pro kinasy (angl. A-kinase anchoring protein, AKAP79/150), který na sebe váže proteinkinasu A (PKA), proteinkinasu C (PKC) a fosfatasu kalcineurin (PP2B), které umísťuje v blízkosti cílových substrátů.

2. Cíle práce

- 1) Charakterizovat parametry chemické a napětové aktivace rekombinantního lidského receptoru TRPA1 a určit podmínky, za kterých dochází k funkčně závislé senzitivaci.
- 2) Zjistit, zda se charakteristiky funkční senzitivace TRPA1 mění v přítomnosti zakotvujícího proteinu AKAP79. Určit vliv tohoto proteinu na expresi TRPA1.
- 3) Na základě analýzy primární sekvence určit potenciální místa, kterými může být lidský TRPA1 regulován fosforylací proteinkinasou C, se zvláštním zaměřením na oblasti, ve kterých se vyskytují jednonukleotidové polymorfismy způsobující záměnu aminokyseliny.
- 4) Pomocí elektrofyziologických a molekulárně biologických technik určit funkční důsledek mutací vytypovaných potenciálních fosforylačních míst TRPA1 náhradou za aminokyselinové reziduum mimikující fosforylaci a za reziduum znemožňující fosforylaci receptoru.
- 5) Charakterizovat funkční a strukturní úlohu reziduí identifikovaných v (4) jako možná místa fosforylace TRPA1. Pomocí molekulárního modelování určit, jak se tato rezidua mohou uplatňovat v regulaci aktivity iontového kanálu.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- **Sigma-Aldrich, USA:** NaCl, KCl, CsCl, MgCl₂, CsOH, NaOH, hydroxid tetramethylamonný (TMA-OH), β -merkapt ethanol, glukóza, hořčnatá sůl adenosintrifosfátu, sodná sůl guanosintrifosfátu, Cs-glukono- δ -lakton, ampicilin, poly-L-lysin, kolagen, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA), kyselina ethylendiaminoctová (EDTA), kyselina octová, agarosa, Trizma base, triton X-100, karvakrol, allylisothiokyanát
- **Geneaid Biotech, USA:** High Speed Plasmid Mini Kit, 10kB DNA Ladder
- **Thermo Fisher Scientific, USA:** DNA Gel Loading Dye (6 \times)
- **PEQLAB Biotechnologie, GmbH, SRN:** barvivo peqGREEN
- **Life Technologies, USA:** OPTI-MEM I médium
- **Agilent Technologies, USA:** QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, polymerasa PfuUltra
- **SERVA Electrophoresis GmbH, SRN:** pepton z kaseinu, extrakt z kvasinek
- **Biolife, IT:** Živný agar N°2
- **IBA GmbH, SRN:** transfekční činidlo „Magnet-assisted Transfection (MATra)“
- **Penta, CZ:** ethanol

3.2 Biologický materiál

- kompetentní bakteriální buňky XL10-Gold kmene *E. coli* (Agilent Technologies, USA)
- lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (HEK293T) (LGC Standards, VB)
- cDNA hTPRA1 ve vektoru pCMV6-XL4 (OriGene, USA)
- cDNA hTRPA1-tGFP ve vektoru pCMV6-AC-GFP (OriGene, USA)
- cDNA AKAP79 ve vektoru pCMV6-XL5 (OriGene, USA)
- plazmid pro zelený fluorescenční protein ve vektoru pQBI 25 (TaKaRa)
- cDNA mCherry-PH ve vektoru pcDNA3.1 (Addgene, USA)
- fetální bovinní sérum (FBS, PAN Biotech GmbH)

3.3 Přístroje

- Zesilovač *Axopatch 200B* (Axon Instruments)
- Invertovaný mikroskop *CKX41* (Olympus)
- Mikromanipulátor *MP-225* (Sutter Instrument)
- Aplikační systém *Was 02*
- Horizontální tahač elektrod *P-1000* (Sutter Instruments Co.)
- Microforge *MF-830* (Narishige)
- Laminární box *VBH C2 (Steril)* (Schoeller Instruments)
- Inkubátor *MCO-36AIC* (Sanyo)
- Autokláv *Sanyo MAC 235EX* (Sanyo)
- Osmometr *Vapro* (Wescor)
- pH metr *Orion Star A111 pH Meter* (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka s ohřevem *Heidolph MR Hei-Tec* (Heidolph Instruments GmbH)
- Centrifuga *Rotilas-mini centrifuge* (Carl Roth GmbH)
- Centrifuga *Mikro 120* (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga *Rotanta 460R* (Hettich Zentrifugen)
- Spektrofotometr *NanoDrop 1000* (NanoDrop Technologies)
- Rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205* (N-Biotek)
- Termocycler *Mastercycler personal* (Eppendorf)
- Vortex *Wizard Advanced IR Vortex Mixer* (VELP Scientifica)
- Vortex *MS 2 Minishaker* (IKA)
- Automatické pipety (Wilson, Nichipet EX)
- Inverzní mikroskop *Leica DMI8* (Leica Microsystems GmbH)
- Systém pro snímání živých buněk *H301-T-UNIT-BL-PLUS* (Oko-Lab)

3.4 Roztoky

Roztoky použité pro horizontální elektroforézu

TAE pufr (50× koncentrovaný): 2M Trizma base, 1M kyselina octová, 50mM EDTA, před použitím 50× ředěn

Roztoky použité při kultivaci buněk

Fosfátový pufr (PBS): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄, 4,3mM Na₂HPO₄, pH 7,3 (upraveno NaOH)

LB médium (angl. lysogeny broth medium): 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek, 1% (w/v) pepton, 0,26M NaCl

Versenův roztok: PBS, 0,68mM EDTA a 87μM trypsin, pH 7,3

Roztoky použité pro elektrofyziologickou techniku patch-clamp

Extracelulární roztok: 140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES, 10mM glukóza, pH 7,4 (upraveno TMA-OH), osmolalita 300 mmol.kg⁻¹

Intracelulární roztok: 125mM Cs-glukono-δ-lakton, 15mM CsCl, mM EGTA, 10mM HEPES, 0,5m CaCl₂, 2mM ATP, 0,3mM GTP, pH 7,4 (upraveno CsOH), osmolalita 286 mmol.kg⁻¹

3.5 Postup práce

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Pro zavedení vybraných mutací do primární sekvence lidského kanálu TRPA1 byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR). V prvním kroku byly pro PCR navrženy primery pro vybrané mutace T670D, T670G, T673D, S443D, S1002D, S1002A, S602D, S602G, S602N, W605A a dvojmutace S602D/K603A a S602D/R604A, které jsou shrnuty v Tabulce č. 1 (str. 31).

Tabulka 1: Mutace hTRPA1 a příslušné navržené primery pro PCR

Mutace	Primery (templátový + komplementární)
T670D	5´-CCATTAGAATT <u>CGAC</u> AAAAAACACCTACACAGG-3´ 5´-CCTGTGTAGGTGTTTTTTT <u>GTC</u> GAATTCTAATGG-3´
T670G	5´-CCATTAGAATT <u>CGG</u> AAAAAACACCTACACAGG-3´ 5´-CCTGTGTAGGTGTTTTTTT <u>GCC</u> GAATTCTAATGG-3´
T673D	5´-GAATTCACCAAAAAAG <u>ACC</u> CTACACAGGATG-3´ 5´-CATCCTGTGTAGGGTCTTTTTTGGTGAATTC-3´
S443D	5´-CCATTCATTCCAAG <u>ACA</u> AGATAAGAAATCACC-3´ 5´-GGTGATTTCTTATCTTT <u>GTC</u> TTTGGAAATGAATGG-3´

Mutace	Primery (templátový + komplementární)
S1002D	5´-GGATCAGAAAG <u>AGAC</u> ACCATCGTGTATCCC-3´ 5´-GGGATACACGATGGT <u>GTCT</u> TTTCTGATCC-3´
S1002A	5´-GGATCAGAAAG <u>CC</u> ACCATCGTGTATCCC-3´ 5´-GGGATACACGATGGT <u>GGCT</u> TTTCTGATCC-3´
S602D	5´-CGATCATCAGGG <u>GAC</u> AAAAGATGGG-3´ 5´-CCCATCTTTT <u>GTCC</u> CTGATGATCG-3´
S602G	5´-CGATCATCAGGGG <u>CA</u> AAAAGATGGG-3´ 5´-CCCATCTTTT <u>GCCC</u> CTGATGATCG-3´
S602N	5´-CGATCATCAGGA <u>ACA</u> AAAAGATGGG-3´ 5´-CCCATCTTTT <u>GTT</u> CCTGATGATCG-3´
W605A	5´-GGAGCAAAAGAG <u>CGG</u> ATGAATGTC-3´ 5´-GACATTCATCC <u>GCT</u> CTTTTGCTCC-3´
S602D/ K603A	5´-CGATCATCAGGG <u>GACGCA</u> AGATGGG-3´ 5´-CCCATCTT <u>GCGTCC</u> CTGATGATCG-3´
S602D/ R604A	5´-CAGGG <u>ACAA</u> <u>GCAT</u> GGGATG-3´ 5´-CATCCCATGCTTT <u>GTCC</u> CTG-3´

Reakční směsi PCR byly připravovány podle návodu „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“. Reakční směs byla míchána z jednotlivých složek uvedených v Tabulce č. 2 (str. 33) na ledu s použitím přirozeného typu lidského TRPA1 (angl. wild type human TRPA1, WT hTRPA1 v plazmidu pCMV6-XL4) jako dsDNA templátu. Optimalizované teplotní schéma reakce je vyobrazeno v Tabulce č. 3 (str. 33), použity byly tři různé teploty kroku 3 (nasedání primerů) – 49 °C (S602D, S602D, S602D/K603A, S602D/R604A, T670G, T670D, W605A), 55 °C (S443G, S443D, T673D, S1002A, S1002D) a 59 °C (S602G). Standardně se klony připravují při teplotě 49 °C a v případě, že PCR reakce neproběhla správně, volí se následně teplota nasedání primerů 55 nebo 59 °C. Čtvrtý krok reakce byl nastaven na 16 minut podle protokolu – rychlost polymerasy je 1 min/kB délky plazmidu (délka plazmidu kódujícího hTRPA1 je 10 kbp).

Po dokončení PCR reakce byly vzorky inkubovány jednu hodinu v termostatu (37 °C, 5% CO₂) s 1 µl restrikčního enzymu DpnI (10 U/µl) pro rozštěpení methylované templátové dsDNA a vortexovány každých 15 minut. Přítomnost PCR produktu byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy.

Tabulka 2: *Reakční složky PCR*

Reakční složka	Množství [μl]
10× reaction buffer	5,00
dsDNA templát (100 ng)	1,00
primer sense (20 μM)	1,25
primer antisense (20 μM)	1,25
dNTP mix	1,00
Quik Solution	3,00
dH ₂ O	36,5
PfuUltra polymeráza (2,5 U/μl)	1,00

Tabulka 3: *Teplotní schéma PCR*

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1.	95 °C	60 s	-
2.	95 °C	50 s	25×
3.	49 °C/ 55 °C/ 59 °C	50 s	
4.	68 °C	16 min	
5.	68 °C	10 min	
6.	4 °C	∞	-

3.5.2 Kontrola přítomnosti PCR produktů pomocí horizontální elektroforézy

Ověření přítomnosti PCR produktu bylo provedeno pomocí horizontální elektroforézy. Plazmidy připravené pomocí PCR byly rozděleny pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarosovém gelu a Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru. Gel byl připraven rozpuštěním 3 g agarosy v 29,4 ml destilované vody a 600 μl 50× TAE. Roztok agarosy byl přiveden k varu a poté ochlazen na teplotu ~40 °C, do ochlazeného roztoku bylo přidáno 1,5 μl barvy peqGREEN. Roztok byl nalit do nalévací aparatury a poté byl instalován vzorkový hřeben. Po přibližně 45minutové inkubaci gelu při laboratorní teplotě za tmy byl tuhý gel umístěn do elektroforetické vany s 1× TAE pufrem, do vzorkových jamek bylo pipetováno vždy 5 μl PCR produktu nebo 3 μl standardu molekulových hmotností s 2 μl DNA vzorkovací barvy. Elektroforéza probíhala 30 minut za konstantního napětí 80 V, poté bylo napětí

zvýšeno na 100 V na dalších 20-30 minut (dokud čelo elektroforézy nedosáhlo vzdálenosti přibližně jeden centimetr před koncem gelu). Pomocí UV lampy byly vzorky vizualizovány. Požadovaný PCR produkt, tedy plazmid kódující kanál hTRPA1 s požadovanou mutací, má velikost přibližně 10 kDa. PCR produkty s potvrzeným plazmidem o dané velikosti byly dále využity pro jejich amplifikaci v buňkách *E. coli*.

3.5.3 Transformace ultrakompetentních XL10-Gold buněk *E. coli* metodou teplotního šoku

Plazmidy kódující hTRPA1 se zavedenou mutací byly z důvodu jejich zmnožení vneseny do ultrakompetentních buněk *E. coli* metodou teplotního šoku podle upraveného protokolu „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“. Celý následující postup probíhá na ledu. Buňky byly rozmrazeny a do vychlazených mikrozkušavek bylo pipetováno 30 µl buněčné suspenze a 2 µl β-merkptoethanolu. Po desetiminutové inkubaci za občasného promíchání směsi byly k buňkám přidány 2 µl PCR produktu, směs byla promíchána a inkubována 30 minut. Poté byly mikrozkušavky se směsí ponořeny na 45 vteřin do vodní lázně předehřáté na teplotu 42 °C a následně byly přeneseny na 2 minuty zpět na led. K buněčné suspenzi s PCR produktem bylo pipetováno 200 µl „lysogeny broth“ (LB) média předehřátého na 42 °C a tato směs byla inkubována na rotačním inkubátoru jednu hodinu (37 °C, 230 RPM). Poté byl celý objem mikrozkušavky pomocí zakřivené skleněné tyčinky (hokejky) rozetřen na agarovou plotnu předehřátou na 37 °C (ampicilin o finální koncentraci 100 mg/l), a po vsáknutí byly plotny inkubovány 16 hodin v převrácené poloze (37 °C, 5% CO₂) a následující den byly uloženy do lednice.

Agarové plotny byly předem připraveny následujícím způsobem – ve 300 ml destilované vody bylo rozpuštěno 1,5 g kvasinkového extraktu, 3 g peptonu a 3 g chloridu sodného. Roztok byl sterilizován v autoklávu (program pro kapaliny, 121 °C, 15 min) a poté ochlazen na přibližně 55 °C. K vychlazenému roztoku bylo přidáno 600 µl ampicilinu o koncentraci 50 g/l a směs byla rozdělena do ~12 misek. Tuhé agarové plotny byly uchovávány v lednici v převrácené poloze.

3.5.4 Amplifikace vybraných kolonií buněk *E. coli*

Pro zvýšení počtu buněk produkujících plazmid zahrnující informaci o pozměněné sekvenci hTRPA1 byly z agarových ploten odebrány sterilní plastovou špičkou uniformní samostatné kolonie. Do 14ml sterilních zkumavek bylo pipetováno vždy 6 ml LB média

s ampicilinem o finální koncentraci 100 mg/l a do tohoto roztoku byla umístěna špička s odebranou kolonií. Zkumavky byly poté inkubovány 16 hod na rotačním inkubátoru při 37 °C (230 RPM).

3.5.5 Izolace plazmidové DNA

Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí chemikálií z komerčně dostupného kitu „High Speed Plasmid Mini Kit“ od firmy Geneaid Biotech (USA) a dle přiloženého návodu. Buněčná suspenze připravená dle postupu v kapitole 4.5.4 byla centrifugována (7 min, 6000× g, 4 °C), supernatant byl odebrán, peleta byla resuspendována v 200 µl PD1 pufru a celý objem byl převeden do mikrozkušavky. K roztoku bylo přidáno 200 µl PD2 pufru a obsah byl ihned promíchán 10× otočením mikrozkušavky o 180°. Po dvouminutové inkubaci bylo přidáno 300 µl PD3 pufru a obsah byl rychle promíchán stejným způsobem jako v předchozím kroku pro vytvoření bílé sraženiny. Následně byly vzorky centrifugovány tři minuty (při pokojové teplotě, 13 000× g – platí také pro všechny následující kroky), supernatant byl odebrán a převeden do mikrokolony (*PD Column*) nad 2ml zkumavku, peleta byla zlikvidována. Obsah mikrokolon byl centrifugován 60 s, retenát byl odstraněn a na mikrokolonu bylo nanášeno 400 µl W1 pufru. Zkumavky byly centrifugovány 60 s, retenát byl opět odstraněn a mikrozkušavky se centrifugovaly další tři minuty pro odstranění veškeré přebytečné kapaliny z filtru. Mikrokolony byly umístěny nad zkumavky s těsně uzavíratelným víčkem, do středu filtru bylo pipetováno 50 µl elučního pufru, po následné dvouminutové inkubaci byly zkumavky dvě minuty centrifugovány, mikrokolony byly odstraněny a výsledná koncentrace DNA konstruktů byla stanovena z hodnoty absorbance stanovené pomocí spektrofotometru *NanoDrop 1000* při vlnové délce 260 nm.

Primární sekvence plazmidové DNA a vnesení mutace bylo následně ověřeno pomocí sekvenování, které provedla firma GATC Biotech, SRN.

3.5.6 Transfekce plazmidu kódujícího mutantní konstrukty TRPA1 do buněk HEK293T

Pro elektrofyziologická měření jsou využívány lidské embryonální buňky HEK293T (angl. human embryonic kidney) exprimující lidský receptor TRPA1 (hTRPA1). Připravený plazmid se zavedenou mutací či plazmid kódující přirozený typ (angl. wild type, WT) hTRPA1 byl do HEK293T buněk vpraven magnetem asistovanou transfekcí (angl. magnet-assisted transfection, MATra) pomocí nanočástic od firmy IBA GmbH. Do zkumavky byla

připravena směs (viz Tabulka č. 4, str. 36) obsahující 50 μ l média Opti-MEM, vhodný objem komerčního transfekčního činidla MATra (např. při použití 600 ng DNA bylo použito 0,7 μ l MATra) a do řádně promíchané směsi média s transfekčním činidlem bylo přidáno 400 ng DNA obsahující sekvenci kódující přirozený typ hTRPA1 či připravený mutantní konstrukt hTRPA1 a 200 ng plazmidu kódujícího zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein, GFP, ve vektoru pQBI 25), v případě kotransfekce se zakotvujícím proteinem AKAP79 bylo do směsi přidáno 200 ng DNA kódující tento protein ve vektoru pCMV6-XL5. Směs byla inkubována 20 minut a následně byl celý objem pipetován do jamky s konfluentně narostlými HEK293T buňkami. Z důvodu transfekce byla jamka s buňkami inkubována na magnetické destičce 20 minut a po odstranění starého média byly buňky opláchnuty jedním mililitrem fosfátového pufru (PBS) a inkubovány s cca 0,5 ml Versenova roztoku s trypsinem po dobu 2 minut (37 °C, 5% CO₂). Uvolněné buňky byly rozmíchány v 0,8 ml 5% fetálního telecího séra (FTS) a 1–2 kapky buněčné suspenze byly přidány do 2 ml 5% FTS v jamce se sklíčkem pokrytým poly-L-lysinem. Takto transfekované buňky byly inkubovány v termostatu (37 °C, 5% CO₂) a pro elektrofyziologická měření byly využívány 24 až 48 hodin po transfekci, kdy mají buňky na sklíčku hustotu přibližně 180 000 buněk·cm⁻².

Tabulka 4: *Množství reakčních složek v transfekční směsi*

reakce	Opti-MEM (μl)	DNA hTRPA1 (ng)	DNA AKAP79 (ng)	DNA GFP (ng)	MATra (μl)
hTRPA1	50	400	-	200	0,7
hTRPA1 + AKAP79	50	400	200	200	0,9

3.5.7 Elektrofyziologická měření

Pro charakterizaci proudově-napěťové závislosti HEK293T buněk exprimujících WT hTRPA1 či mutantní konstrukt kanálu hTRPA1 byla využita elektrofyziologická technika terčíkového zámku (angl. *patch-clamp* [101]). Tato technika spočívá v měření proudu vyvolaného otevíráním iontových kanálů pomocí dvou elektrod – měrné argentchloridové elektrody, která je umístěna ve skleněné kapiláře obsahující intracelulární roztok (ICS, viz kapitola 3.4, str. 30) imitující prostředí buňky, a referenční elektrody, která je ponořena v

extracelulárním roztoku (ECS, viz kapitola 3.4, str. 30) omývajícím měřené buňky. Extra- a intracelulární roztok je navržen tak, aby odpovídal fyziologickému prostředí buňky a zároveň obsahoval všechny komponenty potřebné pro signalizační dráhu, která je v daném experimentu zkoumána.

Buňky jsou umístěny na sklíčku v misce, ve které je extracelulární roztok s ponořenou referenční elektrodou. Skleněné kapiláry jsou připravovány tak, aby šířka jejich ústí odpovídala odporu ~ 5 MOhm v extracelulárním roztoku. Extracelulární roztok buňky při měření omývá, čehož je dosaženo pomocí gravitačního aplikačního systému [102]. Ten je tvořen nádobkami s experimentálními roztoky, ze kterých vedou teflonové hadičky do společného svazku skleněných kapilár, na jehož ústí je nasazena centrální skleněná kapilára. Ústí této aplikační kapiláry je umístěno obvykle 100 μ m od měřené buňky. Pomocí aplikačního systému je možno na buňky přivádět až sedm různých experimentálních roztoků, dostatečně rychlé vyměňování roztoku je zajištěno řízením systému pomocí digitálního převodníku (Digidata 1400) a plynulým odsáváním kapaliny přibývající v misce. Samotné měření spočívá v navedení skleněné kapiláry s měrnou elektrodou obsahující ICS k povrchu buňky, kde je mezi ústím kapiláry a plazmatickou membránou buňky vytvořen odpor v řádu giga ohmů, poté je aplikací podtlaku membrána protržena, ICS se dostává do vnitřního prostředí buňky a po přibližně minutové stabilizaci, kdy dochází k výměně roztoku uvnitř buňky za ICS ve skleněné kapiláře, je na buňku aplikováno napětí podle definovaného protokolu. Proudové odpovědi jsou zaznamenávány pomocí zesilovače (Axopatch 200B) a do počítače převáděny pomocí analogově-digitálního převodníku (Digidata 1400). Záznamy jsou měřeny prostřednictvím softwaru pCLAMP10 sestávajícího z modulu Clampex 10 určeného pro digitalizaci signálu a generování membránového potenciálu a modulu Clampfit 10 určeného pro vysoce specializovanou analýzu elektrofyziologických signálů.

3.5.8 Konfokální mikroskopie

Pro vyhodnocení míry exprese lidského receptoru TRPA1 na plazmatické membráně HEK293T buněk byla využita konfokální mikroskopie. Pro tuto metodu byly jeden až dva dny před snímáním transfekovány buňky HEK293T lidským ortologem receptoru TRPA1 (přirozený typ hTRPA1 s/bez AKAP79 proteinu nebo mutantní konstrukt hTRPA1). V případě konfokální mikroskopie byly využity konstrukty hTRPA1, které na svém C-konci nesou tGFP od firmy Origene v plazmidu pCMV6-AC-GFP (WT-tGFP,

S602D-tGFP) pro vizualizaci lokalizace kanálu v rámci buňky. tGFP je oproti klasickému GFP izolován z jiného organismu (planktonový korýš *Pontellina plumata*), má vysokou pH-stabilit, rychlou viditelnost a má mírně odlišné hodnoty excitace a emise [103]. Pro obarvení membrány byly využity dvě odlišné metody. V jednom případě byl s hTRPA1 kotransfekován mCherry protein (mCherry-PH ve vektoru pcDNA3.1, ukotvený na N-konci delta podjednotky fosfolipázy C), který obsahuje doménu vázající se na fosfatidylinositol v membráně. Druhou metodou bylo barvení komerčně dostupnou barvou CellBrite™ Fix 640 od firmy Biotum (detailní postup v textu této kapitoly na str. 38).

Transfekce

Pro mikroskopii byly HEK293T buňky transfekovány stejným způsobem jako pro elektrofyziologickou techniku *patch-clamp*, výjimkou bylo použití značeného hTRPA1 pomocí tGFP a množství použité DNA jednotlivých proteinů pro optimalizaci množství transfekčního činidla MATra pro jednotlivé reakce (viz Tabulka č. 5, str. 38). Transfekce byla provedena po optimalizaci dva dny před mikroskopickými experimenty a do misek s proskleným dnem (#1.5 odpovídá tloušťce skla 0,16 – 0,19 mm) o průměru 35 mm. Bylo použito takové množství suspenze buněk, aby bylo možné pozorovat jednotlivé buňky (hustota buněk na sklíčku byla srovnatelná s hustotou buněk potřebnou pro elektrofyziologická měření – 180 000 buněk·cm⁻²).

Tabulka 5: Schéma množství DNA pro transfekci a metoda barvení membrány

reakce	DNA hTRPA1 (ng)	DNA AKAP79 (ng)	DNA mCherry-PH (ng)	barvení CellBrite™ Fix
WT-tGFP	600	-	250	-
WT-tGFP	600	-	-	ano
WT-tGFP + AKAP79	400	200	250	-
S602D-tGFP	600	-	250	-
S602D-tGFP	600	-	-	ano

Barvení

Buňky, do kterých nebyl vpraven plazmid kódující mCherry-PH, byly barveny membránovou barvou CellBrite™ Fix 640 těsně před mikroskopováním podle návodu dodaného firmou Biotum. Z buněk v miskách bylo odstraněno staré médium a poté byl do

misek přidán 1 ml PBS s barvou CellBrite™ Fix 640 v poměru 1ml PBS ku 1 µl dodaného roztoku barvy. Buňky byly inkubovány 20 min v 37 °C, 5 % CO₂. Po inkubaci byl roztok s barvou odstraněn a k buňkám byl přidán 1 ml 5% FTS v Opti-MEM, ve kterém byly buňky následně pozorovány.

Konfokální mikroskopie

Experimenty byly provedeny pomocí inverzního mikroskopu *Leica DMI8*, použitý byl vodní objektiv HC PL APOC52 63×/1,20 W, hybridní detektor HyD s rozsahem detekce 400–700 nm a detektor snímající procházející světlo – fotonásobič (TLD). Pro excitaci GFP (488 nm) byl použit argonový laser, pro excitaci mCherry (586 nm) a CellBrite™ Fix 640 (638 nm) byl použit pulzní superkontinuální „bílý“ laser druhé generace WLL2 s rozsahem vlnových délek 470–670 nm. Signál GFP byl detekován v rozsahu 500–560 nm, mCherry-PH v rozsahu 596–700 nm a CellBrite™ Fix 640 v rozsahu 650–700 nm. Pro snímání živých buněk byl použit systém od firmy *Oko-Lab* s kontrolou teploty H301-T-UNIT-BL-PLUS (včetně ohříváče objektivů), koncentrace CO₂ (0-20 %) a O₂ (1-95 %) – CO₂-O₂ Unit-BL. Buňky byly umístěny do komůrky H301-K-FRAME vyhřívané na 37 °C a s obsahem 5 % CO₂.

Pro pozorování byly vybírány GFP-pozitivní buňky, nejlépe samostatné nebo v minimálním kontaktu s ostatními buňkami. Snímky byly pořizovány v hloubce 8 nebo 16 bitů a matematicky vyhodnocovány v programu ImageJ 1.5 a SigmaPlot 10.0.

3.5.9 Molekulární modelování

Molekulární modelování umožňuje získat na atomární úrovni informace o dynamickém chování biomolekul, což může být přínosné pro interpretaci výsledků experimentu a pro objasnění mechanismů fungování složitých biomolekulárních systémů.

Klasické molekulárně dynamické simulace prezentované v této práci byly provedeny pomocí softwarového balíku NAMD, který umožňuje výpočet tzv. trajektorií pro velké biomolekulární systémy obklopené vodní obálkou [104].

Pohybové rovnice

Pro výpočet pohybu atomů (trajektorií) využívá NAMD Newtonovu pohybovou rovnici

$$m_{\alpha} \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{d}{d\vec{r}_{\alpha}} U_{total}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n) = \vec{F}; \quad \alpha = 1, 2 \dots N, \quad (1)$$

kde m_{α} značí hmotnost atomu α , \vec{r}_{α} je jeho pozice, U_{total} je celková potenciální energie, která závisí na pozici všech atomů a \vec{F} je síla působící na částici.

Silové pole (force field)

V simulovaném systému každý atom podléhá síle, která odpovídá interakci se zbytkem systému. NAMD využívá běžnou funkci pro potenciální energii (tzv. force field), která se skládá z několika složek

$$U_{total} = U_{vazba} + U_{úhel} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{Coulomb}. \quad (2)$$

První tři příspěvky (tzv. vazebné) jsou charakterizované následujícími rovnicemi

$$U_{vazba} = \sum_{vazby\ i} k_i^{vazba} (r_i - r_{0i})^2, \quad (3)$$

$$U_{úhel} = \sum_{úhly\ i} k_i^{úhel} (\theta_i - \theta_{0i})^2, \quad (4)$$

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedral\ i} \begin{cases} k_i^{dihe} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)], & n_i \neq 0 \\ k_i^{dihe} (0_i - \gamma_i)^2 & n = 0, \end{cases} \quad (5)$$

kde U_{vazba} představuje energetické příspěvky od všech kovalentních vazeb v simulovaném systému, které jsou reprezentované prostřednictvím harmonických potenciálů. $U_{úhel}$ je energie příspěvků plynoucích z vychýlení úhlů θ z rovnovážných poloh. Jedná se o úhly, které svírají dvojice atomů připojené kovalentně ke společnému třetímu atomu. $U_{dihedral}$ jsou energetické příspěvky od všech tzv. dihedrálních (či torzních) úhlů. Jedná se o úhly ϕ mezi dvěma kovalentními vazbami, které jsou oddělené třetí centrální kovalentní vazbou.

Zbylé dva příspěvky (tzv. nevazebné) představují van der Waalsovy interakce (U_{vdW}) a elektrostatické interakce ($U_{Coulomb}$) popsané rovnicemi

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (6)$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}, \quad (7)$$

kde U_{vdW} je reprezentována tzv. Lennardovým-Jonesovým (LJ) potenciálem – r_{ij} představuje vzdálenost dvou atomů, σ_{ij} je meziatomová vzdálenost za nulového LJ potenciálu a ε_{ij} je hloubka potenciálové jámy. Suma elektrostatických interakcí $U_{Coulomb}$ je vypočtena na základě Coulombova zákona, kde q_i je náboj částice i a ε_0 je permitivita vakua.

Verletův algoritmus

Pro řešení Newtonových pohybových rovnic se využívá tzv. Verletův algoritmus, který lze odvodit prostřednictvím Taylorova rozvoje polohy částice x v čase $t + h$ (kde $h = \Delta t$)

$$x(t + h) = x(t) + h\dot{x}(t) + \frac{h^2}{2}\ddot{x}(t) + O(h^3), \quad (8)$$

kde \dot{x} je derivace polohy podle času, tedy rychlost v , a \ddot{x} je druhá derivace polohy, tedy zrychlení a .

Po dosazení v za \dot{x} a F/m za \ddot{x} do této rovnice získáme vztah

$$x(t+h) = x(t) + hv(t) + \frac{h^2}{2} \frac{F(x(t))}{m} + O(h^3), \quad (9)$$

Analogicky postupujeme v případě výpočtu rychlosti v , kdy počáteční rovnice podle Taylorova rozvoje je

$$v(t+h) = v(t) + h\dot{v}(t) + \frac{h^2}{2} \ddot{v}(t) + O(h^3), \quad (10)$$

kde \dot{v} je první derivace rychlosti, tedy zrychlení, a \ddot{v} je druhá derivace rychlosti.

Dále rovnici (10) zderivujeme a získáme

$$\dot{v}(t+h) = \dot{v}(t) + h\ddot{v}(t) + O(h^2). \quad (11)$$

Ekvivalentními úpravami dostaneme výraz

$$\frac{h^2}{2} \ddot{v}(t) = \frac{h}{2} (\dot{v}(t+h) - \dot{v}(t)) + O(h^3). \quad (12)$$

Po dosazení tohoto členu do rovnice (10) pak dostaneme

$$v(t+h) = v(t) + h\dot{v}(t) + \frac{h}{2} (\dot{v}(t+h) - \dot{v}(t)) + O(h^3). \quad (13)$$

Po dosazení Newtonovy pohybové rovnice vznikne finální rovnice

$$v(t+h) = v(t) + \frac{h}{2m} (F(x(t+h)) + F(x(t))) + O(h^3). \quad (14)$$

Tzv. rychlostní Verletův algoritmus pak spočívá v opakovaném řešení rovnic (9) a (14).

Termostat

Prosté numerické řešení Newtonových pohybových rovnic generuje simulovaný systém s konstantní celkovou energií (NVE). Při simulacích molekulární dynamiky (MD) biomolekulárních systémů je však žádoucí, aby byla zachována teplota a tlak (NPT systém). Konstantní teploty je dosaženo tak, že je do systému přidán tzv. termostat, což vede k tzv. Langevinově rovnici

$$M\dot{v} = F(r) - \gamma v + \sqrt{\frac{2\gamma k_B T}{M}} R(t), \quad (15)$$

kde M je hmotnost, \dot{v} je zrychlení, F představuje sílu, r je pozice, γ je koeficient tření, k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota a $R(t)$ představuje člen náhodných sil působících na částice. V konečném výsledku dochází k fluktuaci teploty simulovaného systému okolo stanovené hodnoty.

Cytoplazmatický C-konec

Pro doplnění nerozlišeného proximálního C-konce (1007–1030) byl vytvořen homologní model smyčky C-konce pomocí bioinformatického portálu Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) [105], který byl vložen do struktury (PDB: 3J9P [11]). Poté byla pro metodu molekulárního dynamického flexibilního „fitování“ (angl. molecular dynamics flexible fitting, MDFF) použita původní mapa kryoelektronové hustoty (EMBD-6267). Metoda MDFF umožnila vytvořit strukturu, kde modelovaný C-konec zaujímá uspořádání zachycené v mapě elektronové struktury. MDFF bylo provedeno podle standardního protokolu, který je popsán v souboru „MDFF Tutorial“ dostupném na stránce [106]. Následně byla pro takto získanou strukturu provedena simulace molekulární dynamiky. Struktura byla vložena do fosfolipidové dvojvrstvy tvořené 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholinem (POPC), následně solvatována molekulami vody TIP3P a ionizována 0,5M NaCl. Pro MD byl využit softwarový balík NAMD (angl. nanoscale molecular dynamics), který se využívá pro velké proteinové struktury [104]. Pro kontrolu teploty (285 K) byla využita Langevinova dynamika a pro udržení tlaku 0,1 MPa byla použita Langevinova pístová metoda. Systém byl nejprve minimalizován, teplota byla zvýšena na 285 K a poté byla vytvořena MD trajektorie o délce 100 ps.

Výsledky tohoto modelování nejsou součástí předložené práce, ale byly publikovány v článku, který je součástí přehledu publikací (Publikace 3).

Všechny MD v této práci byly provedeny podle výše popsaných kritérií. Výsledné trajektorie byly vizualizovány a vyhodnocovány v programu VMD 1.9 [107]. Obrázky pro diplomovou práci byly vytvořeny v programu Chimera 1.14 [108].

Charakterizace oblasti Ser602

Pro strukturní charakterizaci oblasti Ser602 byly pomocí pluginu „Mutate residue“ v programu VMD 1.9 vytvořeny tři mutantní konstrukty TRPA1 (v rámci nové struktury apo-TRPA1 z roku 2020, PDB: 6PQQ) – S602D, S602N a W605A. Pro všechny tři struktury byla provedena MD podle výše popsaného postupu. Ve všech případech vznikly trajektorie o délce 20 ps.

Elektrostatický potenciál TRPA1 WT, S602D a p-Ser602

Struktura apo-TRPA1 z roku 2020 (PDB: 6PQQ) byla využita pro charakterizaci elektrostatického potenciálu, který byl vytvořen pro WT TRPA1, fosfomimikující mutaci S602D (postup popsán v předchozím odstavci) a pro fosforylovaný stav na

aminokyselinovém zbytku Ser602 (struktura p-Ser602). Fosforylovaný stav TRPA1 byl vytvořen v programu VMD 1.9 pomocí pluginu „Automatic PSF builder“, za použití příslušného parametrového souboru (toppar_all36_prot_na_combined.par). Byly generovány dva fosforylované stavy – monoanion (SP1) a dianion (SP2) fosfoserinu. Pro obě struktury byla provedena MD (dle stejného postupu jako v předchozích případech) a vznikly trajektorie o délce 100 ps. Ve všech případech byl z posledního snímku vizualizován elektrostatický potenciál v programu VMD 1.9 pomocí pluginu „PME Electrostatics“. Výsledné mapy elektrostatického potenciálu byly analyzovány v programu Chimera 1.14.

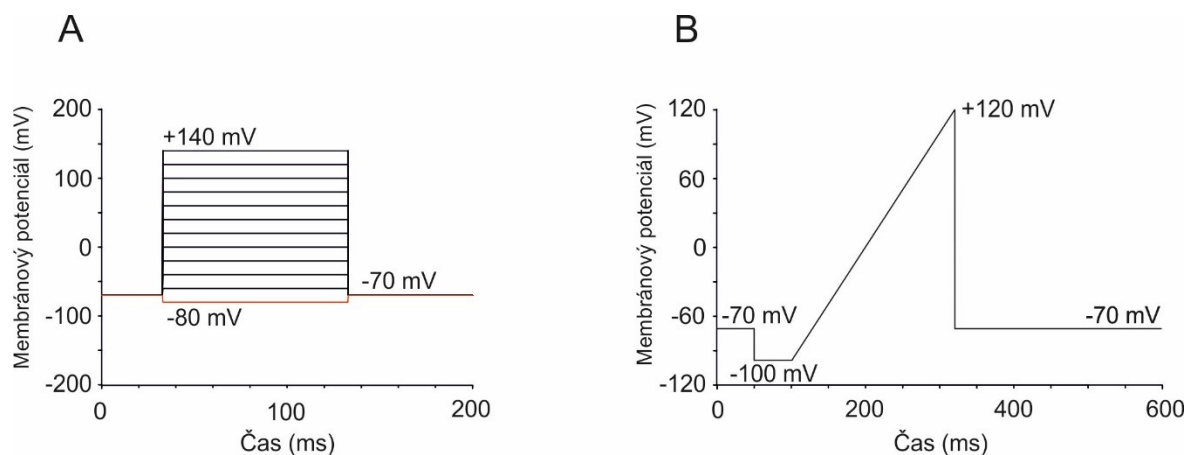
3.5.10 Napěťová a chemická aktivace TRPA1

Pomocí elektrofyziologické techniky *patch-clamp* byly měřeny proudové odpovědi kanálů TRPA1 exprimovaných v GFP pozitivních HEK293T buňkách. V počáteční sérii experimentů byla zjišťována míra senzitivace WT TRPA1 pomocí tzv. „gap-free“ protokolu, kdy bylo napětí udržováno na -70 mV a opakovaně byl aplikován neelektrofilní agonista (karvakrol) po dobu 15 s v minutových intervalech. Proudové odpovědi byly zaznamenávány po dobu pěti minut (viz Obrázek 11, str. 48).

Připravené mutace a WT TRPA1 byly charakterizovány pomocí dvou různých napěťových protokolů: skokově se zvyšující napěťový protokol určený pro stanovení proudově-napěťové (I/V) charakteristiky na počátku ($I/V(0)$) a na konci ($I/V(180)$) snímání. Pro určení časového průběhu amplitudy proudových odpovědí na záporných (-100 mV) a kladných ($+120$ mV) membránových potenciálech byl použit lineárně se zvyšující napěťový protokol (angl. ramp).

I/V protokol: Na buňku jsou aplikovány skokově proměnné napěťové pulzy nejprve poklesem z napětí -70 mV na -80 mV a pak následně se zvyšující po $+20$ mV až do hodnoty $+140$ mV. Aplikováno bylo celkem 12 pulzů trvajících 100 ms vždy po 500 ms (viz Obrázek 8A, str. 44).

Ramp protokol: Protokol spočívá v aplikaci lineárně se zvyšujícího napětí z hodnoty -100 mV na hodnotu $+120$ mV rychlostí 1 V/s. Tento protokol je aplikován opakovaně každých 5 vteřin po dobu až tří minut (tři minuty v případě napěťové charakterizace, jedna minuta v případě aplikace agonisty, viz níže) (viz Obrázek 8B, str. 44). Mezi jednotlivými pulzy je buňka udržována na membránovém potenciálu -70 mV.



Obrázek 8: Proudově-napěťové protokoly použité pro elektrofyziologickou charakterizaci kanálu TRPA1 – A) I/V protokol a B) ramp protokol.

V případě chemické aktivace byly použity dva různé agonisté – 100 μ M AITC (elektrofilní aktivátor) nebo 50 μ M karvakrol (neelektrofilní aktivátor) – za současné napěťové stimulace protokolem (B) (viz Obrázek 8B, str. 44). Třicet sekund byl aplikován kontrolní extracelulární roztok (ECS), poté byl na dvacet až třicet sekund aplikován agonista a následně byl třicet až čtyřicet sekund aplikován kontrolní (ECS) roztok (viz Obrázek 18B, str. 59).

3.5.11 Vyhodnocování dat z elektrofyziologických a mikroskopických měření

Hodnocení záznamů a statistické vyhodnocování elektrofyziologických dat

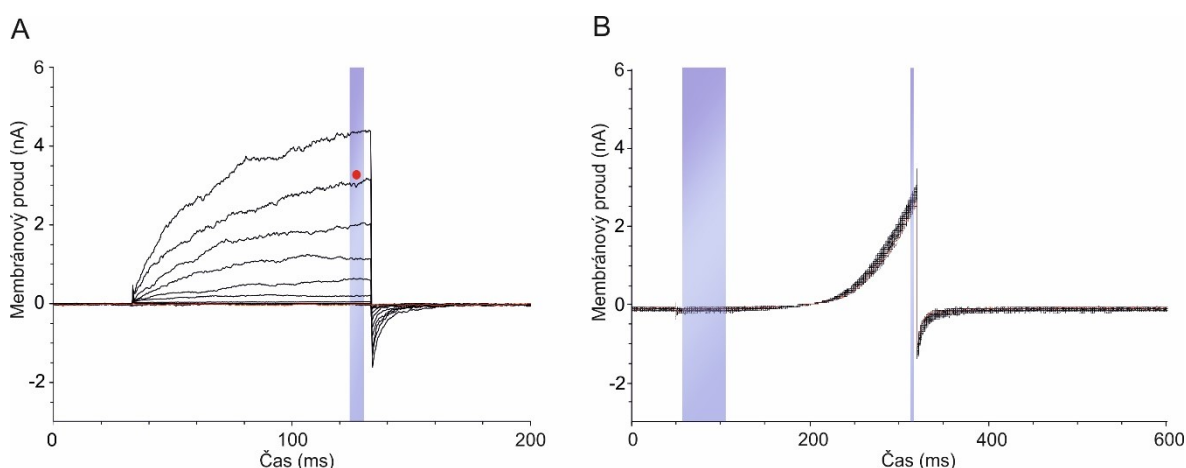
Všechny elektrofyziologické záznamy byly vyhodnocovány v programu Clampfit 10 a následně v programu SigmaPlot 10.0, ve kterém byla provedena také statistická analýza a grafická reprezentace výsledků.

V případě charakterizace vnitřní senzitivace WT TRPA1 byly v rámci „gap-free“ protokolu vypočítány průměrné odpovědi na aplikaci agonisty a porovnávána byla třetí a pátá odpověď na modulátor.

Ze záznamů I/V protokolu byla vytvořena tzv. I/V proudově-napěťová závislost, pro níž byla odečítána průměrná hodnota proudové odpovědi na konci pulzu (95-99 ms), kdy se aktivita kanálu TRPA1 dostává do rovnovážného stavu (viz Obrázek 9A, str. 45). Tyto průměrné proudové odpovědi byly vyneseny v závislosti na vloženém napětí a z tohoto grafu byla odhadnuta hodnota reverzního potenciálu V_{rev} , což je hodnota membránového potenciálu, při které se mění polarita proudové odpovědi. Amplituda proudových odpovědí se následně vydělí příslušným potenciálem zmenšeným o hodnotu V_{rev} ($V - V_{rev}$). Tímto způsobem je získána závislost vodivosti na vloženém napětí (tzv. G/V závislost). Pro

porovnání dat v Obrázku 12, str. 49 byla hodnota proudových odpovědi vydělena odpovídající kapacitou buňky, čímž byla získána hodnota tzv. proudové hustoty v závislosti na vloženém napětí.

Ze záznamů získaných protokolem (B) byly odečítány průměrné hodnoty proudových odpovědí na -100 mV a $+120$ mV (viz Obrázek 9B, str. 45) a odečtené hodnoty proudů byly vyneseny v závislosti na čase. V případě aplikace agonisty byly porovnávány hodnoty před aplikací agonisty a průměrná odpověď v průběhu aplikace agonisty (viz Obrázek 18, str. 59).



Obrázek 9: Příklady záznamů proudových odpovědí WT TRPA1. A) Z I/V charakteristiky se odečítá průměrná proudová odpověď na konci pulzu (modrý obdélník). Červená tečka zobrazuje proudovou odpověď na $+120$ mV, kterou je možné porovnat s odpovědí ze záznamu lineárního protokolu. B) Z lineárního protokolu se odečítá průměrná proudová odpověď na -100 mV a na $+120$ mV (modré obdélníky).

Konfokální mikroskopie

Na konfokálním mikroskopu byly snímány tGFP pozitivní buňky, které byly kotransfekovány s mCherry-PH proteinem, nebo byly obarveny těsně před zobrazením membránově specifickou barvou CellBrite™ Fix 640. Obrázky byly pořízeny v rozlišení 1024×1024 pixelů (v barevné hloubce 8 nebo 16 bitů) a míra exprese proteinu TRPA1 (WT, mutace nebo kotransfekce s AKAP79) byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ 1.5 a SigmaPlot 10.0.

V programu ImageJ 1.5 byl využit zásuvný modul „Colocalization Finder“ pro určení kolokalizace TRPA1-tGFP (značený zeleně) a membrány (značená červeně). Body, ve kterých byla přítomna červená i zelená barva jsou pomocí tohoto modulu označeny bíle.

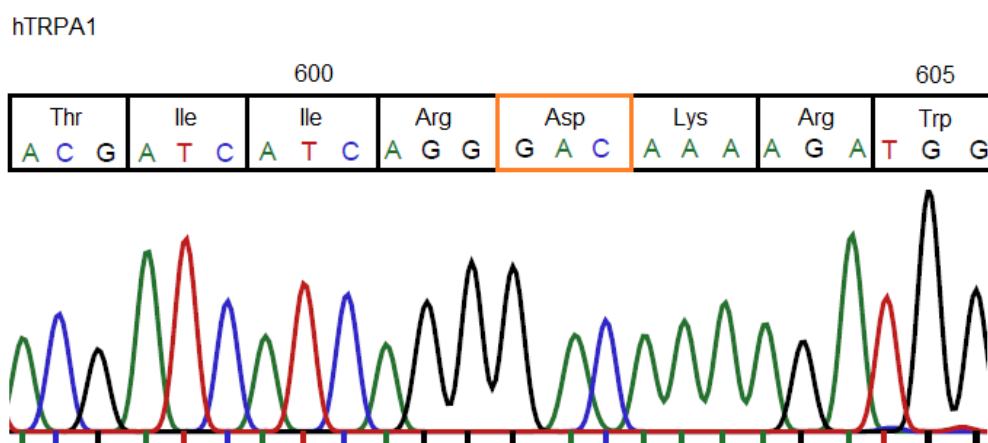
Druhý přístup, kterého bylo využito pro stanovení míry exprese, bylo určení maxima intenzity dané barvy v oblasti membrány. V případě mCherry-PH a membránové barvy CellBrite™ Fix 640 je membrána označena červeně a TRPA1-tGFP značen zeleně.

V obdélníkovém průřezu buňkou jsou v programu ImageJ 1.5 vybrány hodnoty intenzit červené a zelené barvy a v programu SigmaPlot 10.0 jsou tyto hodnoty dány do grafické závislosti.

4. Výsledky

4.1 Výsledky sekvenování plazmidů připravených pomocí PCR

Plazmidy, které byly připraveny pomocí PCR, byly sekvenovány firmou GATC Biotech a výsledky byly analyzovány v programu BioEdit. Nejprve byla vyhodnocena čistota izolované DNA (viz Obrázek 10, str. 47). Sekvenovaná část plazmidu byla porovnána s templátem a na místě vložené mutace bylo ověřeno, zda nová DNA obsahuje požadovaný triplet kódující novou aminokyselinu. Všechny použité DNA neobsahovaly žádnou nečistotu a v primární sekvenci byla ověřena přítomnost správného tripletu.



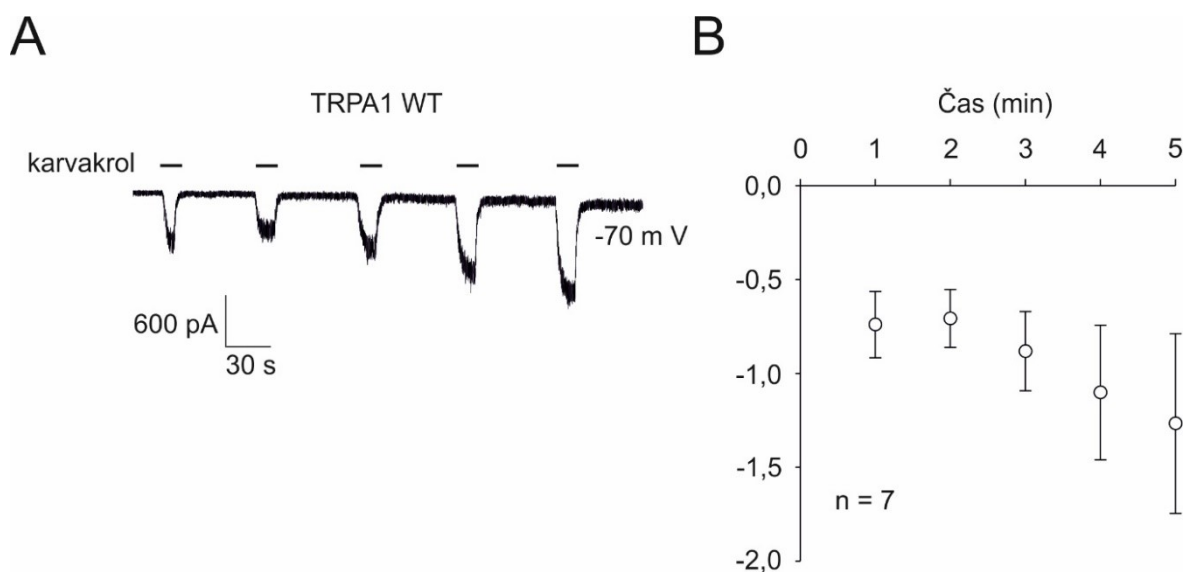
Obrázek 10: Ověření zavedené mutace do primární sekvence receptoru hTRPA1. Oranžový rámeček obsahuje triplet GAC kódující aspartát v sekvenci mutantního konstruktu S602D.

4.2 Senzitizace kanálu TRPA1

V počátečních experimentech byly zjišťovány parametry chemické aktivace TRPA1 pomocí tzv. „gap-free“ stimulačního protokolu a byla vyhodnocována míra senzitizace tak, aby při výsledném optimalizovaném protokolu docházelo k co nejmenšímu zvyšování proudových odpovědí rekombinantního kanálu při opakované aplikaci agonisty.

V případě chemické aktivace neelektrofilním agonistou (50 μ M karvakrol) se zvýšila průměrná proudová odpověď WT TRPA1 na -70 mV z $-739,9 \pm 176,8$ pA (první aplikace agonisty) na $-1266,6 \pm 478,7$ pA (pátá aplikace agonisty) u $n = 7$ buněk (viz Obrázek 11, str. 48).

Abychom minimalizovali míru senzitivace kanálu TRPA1, ke které dochází v případě chemické aktivace, byly pro charakterizaci TRPA1 a jeho konstruktů navrženy a optimalizovány napěťové protokoly popsané v kapitole 3.5.10 na straně 43.



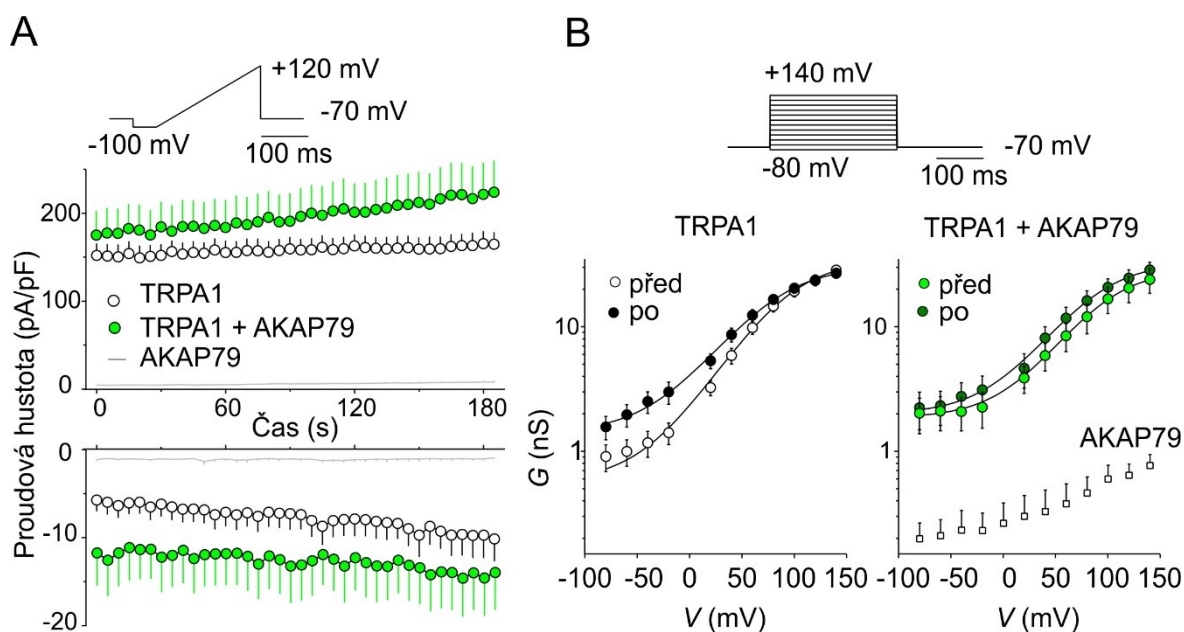
Obrázek 11: Chemická aktivace WT TRPA1. A) Reprezentativní záznam membránových proudů vyvolaných chemickou aktivací WT kanálu TRPA1. Každou minutu byl aplikován neelektrofilní agonista ($50\mu\text{M}$ karvakrol, horizontální čáry nad záznamem) po dobu 15 vteřin a odpovědi byly zaznamenávány pět minut. B) Graf průměrných proudových odpovědí ($n = 7$) na chemickou aktivaci $50\mu\text{M}$ karvakrolem (průměrné hodnoty znázorněny jako bílé symboly a SEM jako vertikální úsečky).

4.3 Vliv přítomnosti AKAP zakotvujícího proteinu na funkci TRPA1

Pro fosforylaci TRPA1 je nutná přítomnost zakotvujícího proteinu AKAP79, který na sebe váže PKA, PKC a kalcineurin. Elektrofyziologickou technikou *patch-clamp* byl pomocí optimalizovaných napěťových protokolů zjišťován účinek AKAP79 na aktivitu WT TRPA1. Bylo zjištěno, že v HEK293T buňkách exprimujících WT TRPA1 se při opakované stimulaci lineárním napěťovým protokolem statisticky významně zvyšuje proudová hustota odpovědí na kladných i záporných potenciálech (viz Obrázek 12A, str. 14) – na -100 mV dochází ke zvýšení z $-6,5 \pm 1,4\text{ pA/pF}$ na $-11,6 \pm 2,8\text{ pA/pF}$ (párový t-test, $P < 0,001$; $n = 17$) a na $+120\text{ mV}$ se proudová hustota odpovědí zvyšuje ze $152,0 \pm 13,8\text{ pA/pF}$ na $164,7 \pm 13,8\text{ pA/pF}$ (párový t-test, $P = 0,034$; $n = 17$). V případě koexprese WT TRPA1 s AKAP79 se na záporných potenciálech (-100 mV) proudové hustoty odpovědí nelišily od WT TRPA1 ($-10,3 \pm 3,2\text{ pA/pF}$ a $-13,6 \pm 4,0\text{ pA/pF}$; párový t-test, $P = 0,159$; $n = 16$). Na kladných membránových potenciálech ($+120\text{ mV}$) se proudové

hustoty odpovědi statisticky významně zvýšily ze $152,4 \pm 25,4$ pA/pF na $193,4 \pm 33,7$ pA/pF (párový t-test, $P = 0,001$; $n = 16$). Jako kontrola byly měřeny proudové odpovědi HEK293T buněk exprimujících AKAP79 a kontrolní plazmid, přičemž naměřené proudové hustoty se ukázaly jako statisticky významně nižší, než hodnoty pro WT či WT AKAP79 (přibližně o řád), a tudíž nepřispívají ke zvyšování proudové hustoty odpovědi TRPA1 při koexpresi s AKAP79 (viz Obrázek 12A, str. 49).

Pro WT TRPA1 a WT TRPA1 + AKAP79 byly ze záznamů membránových proudů vyvolaných aplikací I/V protokolu na počátku měření a po třech minutách snímání vypočítány závislosti vodivosti na vloženém napětí (viz Obrázek 12B, str. 49). Pro oba experimenty byly statisticky porovnány hodnoty vodivosti na záporných a kladných membránových potenciálech. Po třech minutách záznamu se statisticky významně zvýšila vodivost jen v případě WT TRPA1 na záporných potenciálech ($z 0,9 \pm 0,2$ nS na $1,6 \pm 0,3$ nS na -60 mV; párový t-test, $P = 0,019$; $n = 12$), zatímco u WT TRPA1 + AKAP79 se vodivost statisticky významně nezvýšila ($2,0 \pm 0,6$ nS a $2,2 \pm 0,7$ nS; párový t-test, $P = 0,840$; $n = 9$).



Obrázek 12: Charakterizace proudových odpovědí WT TRPA1 a WT TRPA1 v přítomnosti AKAP79. A) V případě ramp protokolu (schéma zobrazeno v horní části obrázku 12A) došlo u WT TRPA1 v přítomnosti AKAP79 (zelené symboly, vertikální úsečky vyznačují hodnoty SEM) oproti WT TRPA1 (bílé symboly) ke statisticky významnému zvýšení na kladných i záporných potenciálech. B) Z hodnot I/V závislostí (vyobrazen nad grafy) byla vytvořena závislost vodivosti G (nS) na vloženém napětí pro samotný TRPA1 a koexprimovaný TRPA1 s proteinem AKAP79. V přítomnosti AKAP79 došlo ke statisticky významnému zvýšení vodivosti na záporných membránových potenciálech.

4.4 Výběr potenciálních fosforylačních míst TRPA1

Tradiční přístupy využívané k predikci fosforylačních míst v rámci aminokyselinové sekvence proteinů vycházejí z předpokladu, že místa potenciální fosforylace jsou zcela nezbytná pro funkčnost proteinu, a proto se zaměřují pouze na evolučně vysoce konzervované aminokyselinové zbytky. Takovým způsobem bylo jinými skupinami již dříve navrženo a charakterizováno několik reziduí myšního TRPA1 [93, 109]. Jiné studie však dávají výskyt potenciálních fosforylačních míst do souvislosti s fenotypovými mezidruhovými rozdíly, jejichž příčinou může být specifická funkce proteinu způsobená fosforylací u jednoho z porovnávaných druhů [88]. Důvodem k těmto změnám v rámci primární sekvence proteinu může být zjištění, že se evolučně snadněji přizpůsobí cílový protein než kinasa, která je evolučně konzervovanější z důvodu široké substrátové specifity.

V této práci jsme zvolili přístup predikce fosforylačních míst lidského TRPA1 v oblastech bohatých na jednonukleotidové polymorfismy (angl. single-nucleotide polymorphism, SNP), které by mohly být příčinou změny specifity kinasy pro daná rezidua, a tím být příčinou fenotypových projevů těchto SNP. Pro výběr potenciálních fosforylačních míst byla využita následující kritéria: potenciální fosforylační místo je predikováno nejméně dvěma ze tří použitých predikčních programů (GPS 5.0 [110], NetPhos 3.1 [111], NetPhorest 2.1 [112]) a vyskytuje se v oblasti bohaté na SNP (viz Obrázek 13B, str. 52). Výsledek predikce pomocí počítačových algoritmů je shrnut v Tabulce 6 (str. 51).

Jedním z využitých predikčních programů je GPS 5.0 [110], který určuje pravděpodobnost fosforylace na základě hypotézy, že podobné krátké peptidy budou mít podobné biochemické vlastnosti. Při analýze byla pro predikci zvolena PKC a prahová hodnota byla nastavena na „medium“ (což odpovídá šesti procentům přípustných falešně pozitivních výsledků).

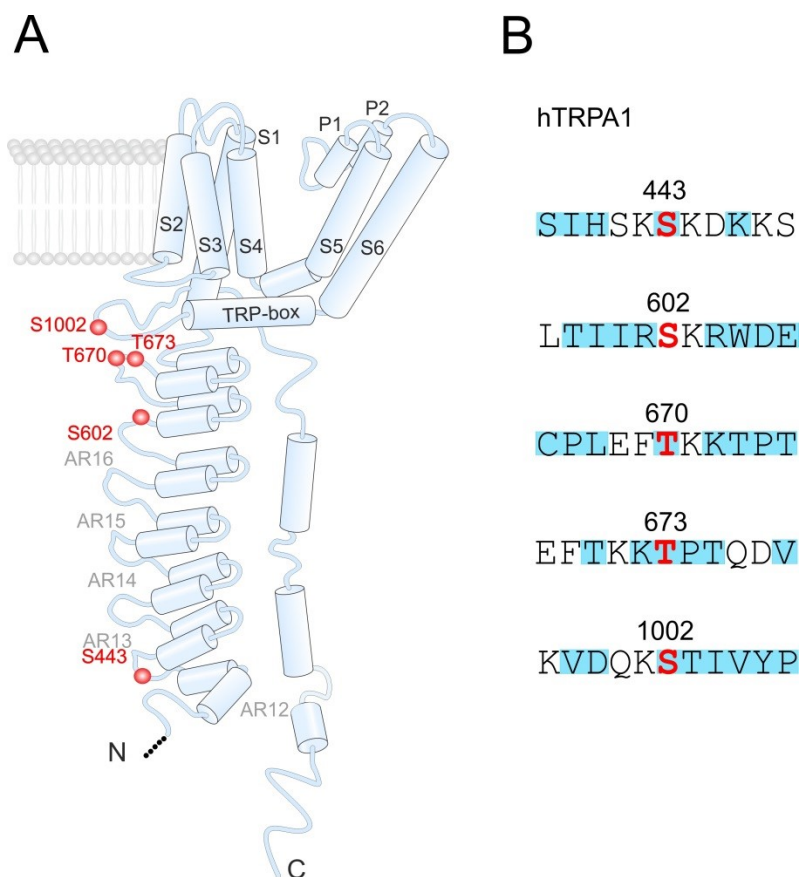
Druhým zvoleným programem je NetPhos 3.1 [111], který využívá již známých fosforylačních míst, která jsou zahrnuta do sekvenčního loga, ze kterého se pak vypočítává pravděpodobnost fosforylace dané sekvence pro serin, threonin a tyrosin kinasy. Hodnoty skóre jsou udávány v rozsahu 0–1 (0 – nulová pravděpodobnost fosforylace; 1 – nejvyšší pravděpodobnost fosforylace). Pro tuto diplomovou práci byla zvolena prahová hodnota skóre 0,5.

Třetím programem je NetPhorest 2.1 [112], který využívá databázi konsenzuálních sekvenčních motivů pro tyrosin, serin a threonin kinasy. Stejně jako v případě programu NetPhos 3.1 je predikce vyhodnocována v hodnotách skóre 0–1 (viz předchozí odstavec) a prahová hodnota byla pro analýzu nastavena na 0,5.

Obrázek 13A (str. 52) ukazuje schématické znázornění TRPA1 podjednotky s vyznačenými aminokyselinovými zbytky, které byly na základě výše zmíněných kritérií vybrány, spolu s výskytem okolních SNP.

Tabulka 6: *Výsledky predikcí potenciálních fosforylačních míst lidského TRPA1 pomocí predikčních serverů a hodnoty skóre pro predikované kinasy*

	GPS 5.0			NetPhos 3.1		NetPhorest 2.1	
	kinasa	skóre	cut-off	kinasa	skóre	kinasa	skóre
Ser443	PKC	4,2	1,8	PKC	0,793	PKC	0,29
				nesp.	0,780		
Ser602	PKC	4,4	2,1	PKC	0,679	PKC	0,35
		15,5	15,4	nesp.	0,520		
Tyr670	PKC	9,0	8,7	nesp.	0,621	PKC	0,21
				PKC	0,603		
Tyr673	-			nesp.	0,534	CDK	0,19
Ser1002	PKC	113,9	104,6	nesp.	0,902	-	
				PKC	0,603		

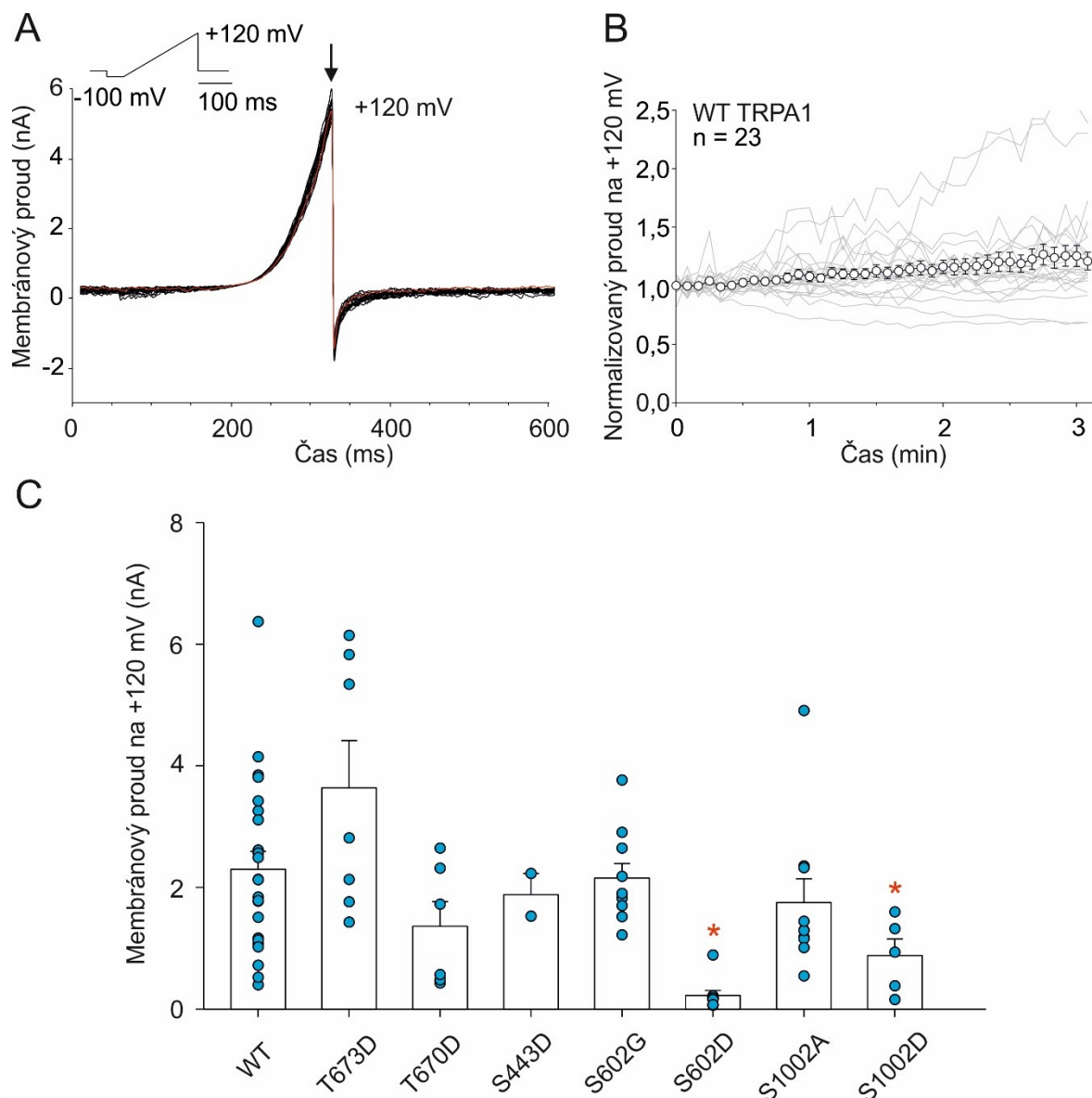


Obrázek 13: Vybraná potenciální fosforylační místa lidského TRPA1 (hTRPA1). A) Schematické znázornění podjednotky kanálu TRPA1 s vybranými potenciálními fosforylačními místy (červené znaky). B) Aminokyselinová sekvence hTRPA1 v místech predikovaných fosforylačních míst (vyznačena červeně). Oblasti vybraných aminokyselinových zbytků jsou bohaté na SNP (modré zvýraznění).

4.5 Proudově-napěťová charakterizace potenciálních fosforylačních míst TRPA1

Vybraná potenciální fosforylační místa TRPA1 vyobrazená na podjednotce TRPA1 na Obrázku 13A (str. 52), která byla vybrána na základě predikčních programů (viz předchozí kapitola, str. 50), byla pomocí SDM (angl. site-directed mutagenesis) změněna na fosfomimikující mutaci, nebo fosforylaci bránící mutaci, nebo pozitivní náboj fixující mutaci a tyto konstrukty byly charakterizovány pomocí elektrofyziologické techniky *patch-clamp*, konkrétně pomocí dvou optimalizovaných napěťových protokolů (viz Obrázek 8A a B, str. 44). Reprezentativní proudová odpověď na lineární napěťový protokol WT TRPA1 je vyobrazena na Obrázku 14A (str. 53). Časová závislost proudových odpovědí WT TRPA1 normalizovaných na první odpověď je vyobrazena na Obrázku 14B (str. 53). Pro vyhodnocení WT a mutantů TRPA1 byly odečítány hodnoty

proudových odpovědí na +120 mV vyvolané prvním napěťovým pulzem (viz Obrázek 14C, str. 53). Statisticky významná změna amplitudy proudových odpovědí vůči WT TRPA1 byla pozorována v případě fosfomimikujícího mutantu S602D (Studentův t-test, $P < 0,001$; $n = 9$) a S1002D (Studentův t-test, $P = 0,039$; $n = 5$), zatímco mutace znemožňující fosforylaci těchto aminokyselinových zbytků S602G (Studentův t-test, $P = 0,768$; $n = 10$) a S1002A (Studentův t-test, $P = 0,281$; $n = 10$) nebyly statisticky významně odlišné od WT TRPA1.

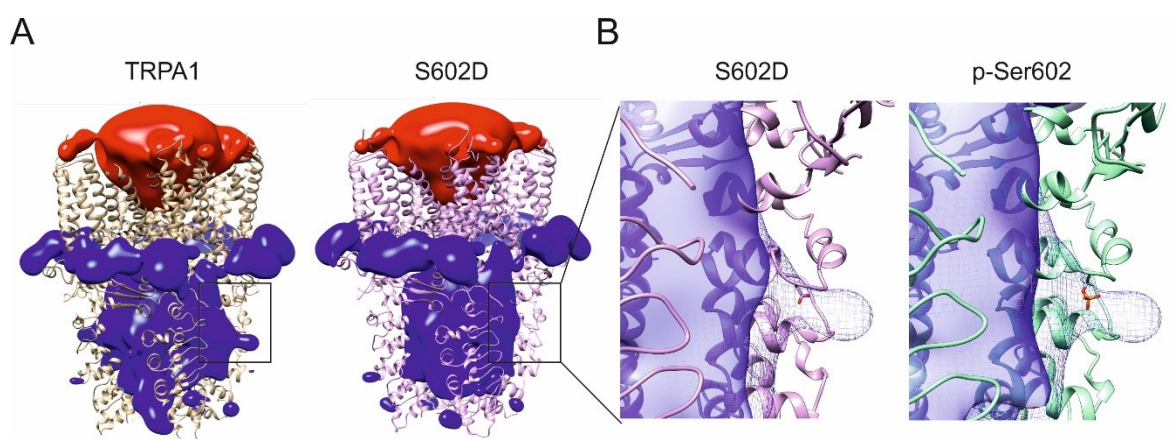


Obrázek 14: Charakterizace potenciálních fosforylačních míst TRPA1 pomocí elektrofyziologické techniky patch-clamp. A) Konkrétní odpověď WT TRPA1 na ramp napěťový protokol, ze kterého jsou odečítány hodnoty na +120 mV (šipka). B) Časová závislost normalizovaných proudových odpovědí WT TRPA1 ($n = 23$) na +120 mV. Průměrné odpovědi všech buněk exprimujících WT TRPA1 jsou vyobrazeny bílými symboly. C) Porovnání prvních odpovědí na lineární napěťový stimulační protokol pro jednotlivé fosfomimikující a fosforylaci zabraňující mutace vůči WT TRPA1. Statisticky významně odlišné mutace jsou označeny červenou hvězdičkou (S602D, $P < 0,001$; S1002D, $P = 0,039$).

4.6 Molekulární modelování – charakterizace oblasti Ser602

Elektrostatický potenciál

Mapy elektrostatického potenciálu pro WT TRPA1, S602D a pro fosforylovaný receptor TRPA1, p-Ser602, byly vyobrazeny a analyzovány v programu Chimera 1.14. V případě mutace S602D došlo v porovnání s WT k výraznému snížení kladného elektrostatického potenciálu v oblasti Ser602 (viz Obrázek 15A, str. 54). Pro porovnání byly simulovány: fosforylovaná struktura TRPA1 na aminokyselinovém zbytku Ser602 (p-Ser602) a aspartát na pozici 602 jako fosfomimikující aminokyselina. Kladný elektrostatický potenciál v oblasti Ser602 pro mutaci S602D a fosforylovaný stav vykazuje podobný efekt z hlediska rozložení elektrostatického potenciálu v okolí pozice 602 (viz Obrázek 15B, str. 54).



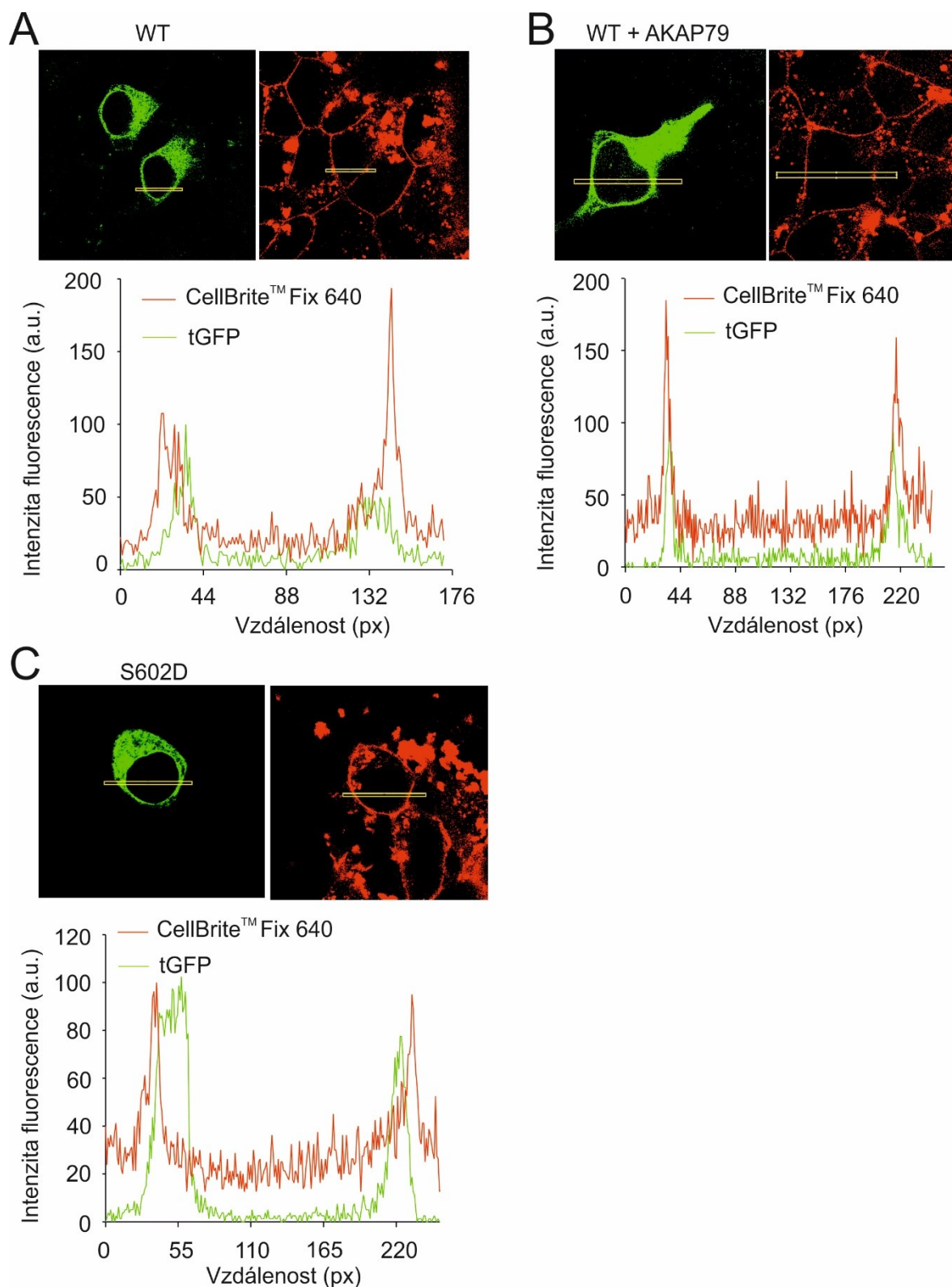
Obrázek 15: Struktura TRPA1 (PDB: 3J9P) a mapy elektrostatického potenciálu pro WT, S602D a p-Ser602. A) Srovnání změny elektrostatického potenciálu mezi WT TRPA1 a S602D – záporný potenciál je vyznačen červeně, kladný potenciál je vyznačen modře. B) Struktura TRPA1 S602D a p-Ser602 s odpovídajícími mapami elektrostatického potenciálu (modrá) spolu s elektrostatickým potenciálem WT TRPA1 (modrá mřížka).

4.7 Exprese variant TRPA1 na plazmatické membráně

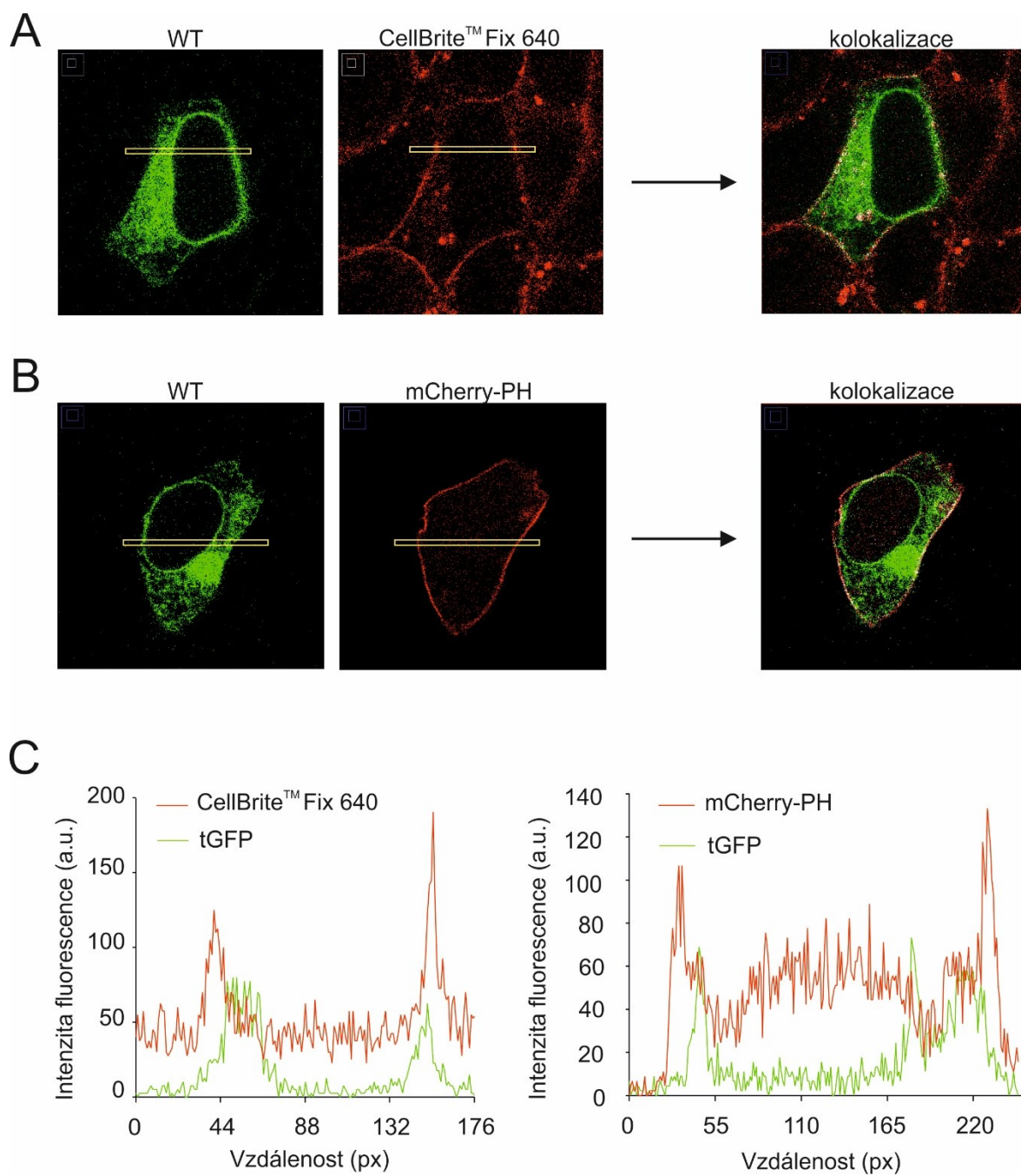
Pomocí konfokální mikroskopie byla sledována exprese variant lidského TRPA1-tGFP receptoru na membránách HEK293T buněk. Byla porovnávána exprese TRPA1-tGFP v přítomnosti AKAP79 a exprese S602D-tGFP vůči WT TRPA1-tGFP (viz Obrázek 16A-C, str. 56). U pěti buněk mutantu S602D byl pozorován podobný profil intenzity fluorescence tGFP vůči barvě CellBrite™ Fix 640, kterou byla označena membrána buňky, jako u WT TRPA1-tGFP (n = 9). Přítomnost AKAP79 (n = 7) měla na

všech snímaných buňkách za následek přesnější překryv lokálních maxim fluorescence tGFP a CellBrite™ Fix 640.

Na Obrázku 17 (str. 57) je porovnání dvou metod značení membrány HEK293T buněk exprimujících TRPA1-tGFP. Buněk barvených specifickou membránovou barvou CellBrite™ Fix 640 bylo snímáno devět a buňky exprimující spolu s TRPA1-tGFP protein mCherry-PH byly snímány čtyři. Ukázalo se, že značení membrány barvou CellBrite™ Fix 640 je nevýhodné z důvodu obarvení všech buněk v zorném poli. Výhodou koexprese s mCherry-PH je naproti tomu selektivní značení pouze pozitivně transfekované buňky exprimující sledovaný protein. V případě barvení CellBrite™ Fix 640 je intenzita fluorescence mnohem výraznější než v případě koexprese s mCherry-PH, kdy se znatelně zvyšuje signál v rámci celé buňky.



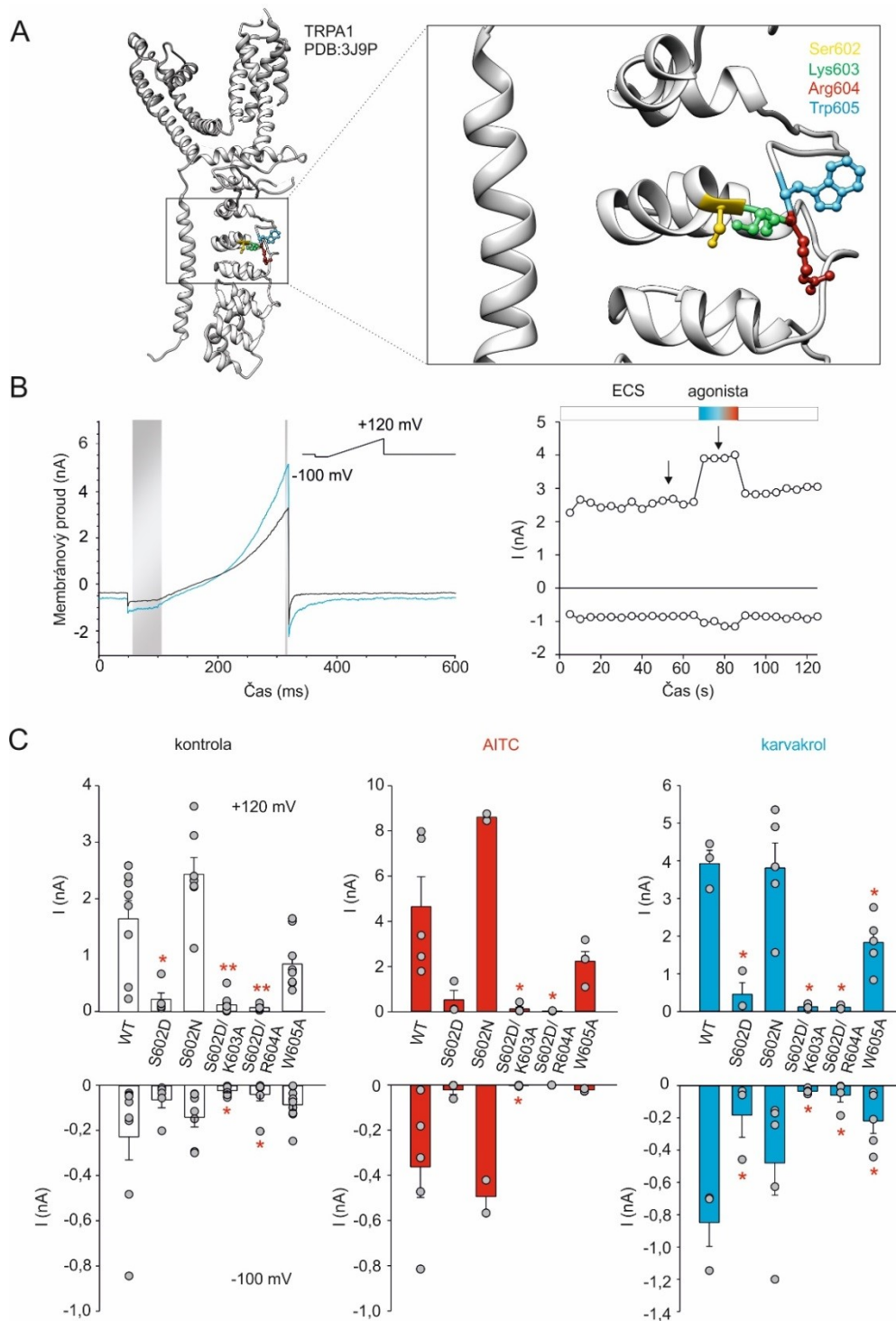
Obrázek 16: Sledování exprese variant TRPA1-tGFP receptoru pomocí konfokální mikroskopie. A) Exprese WT TRPA1-tGFP (zelená), B) WT TRPA1-tGFP v přítomnosti AKAP79 proteinu a C) mutantu S602D-tGFP v HEK293T buňkách. Ve všech případech byla cytoplazmatická membrána značena specifickou barvou CellBrite™ Fix 640 (červená). Grafy zobrazují intenzitu fluorescence obou fluoroforů na průřezu buňky (žlutý obdélník). Snímky byly analyzovány v programu ImageJ 1.5 a SigmaPlot 10.0.



Obrázek 17: Porovnání dvou metod barvení cytoplazmatické membrány HEK 293T buněk. A) Buňky exprimující WT TRPA1-tGFP (zelená) jsou barveny specifickou membránovou barvou CellBrite™ Fix 640 (červená) a v B) je receptor exprimován spolu s mCherry-PH (červená). V obou případech je zobrazena kolokalizace (bílá) tGFP a mCherry-PH nebo CellBrite™ Fix 640 pomocí pluginu „Colocalization Finder“ v programu ImageJ 1.5. C) Grafy zobrazují intenzitu fluorescence obou fluoroforů na průřezu buňky (žlutý obdélník).

4.8 Proudově-napěťová charakterizace funkčních záměn aminokyselinových zbytků z oblasti Ser602 v přítomnosti agonistů

Mutace aminokyselin v oblasti Ser602 (Lys603, Arg604 a Trp605, vyobrazeny v rámci struktury na Obrázku 18A, str. 59) byly charakterizovány pomocí dvou různých napěťových protokolů v přítomnosti agonisty kanálu TRPA1 – AITC (elektrofilní agonista) a karvakrol (neelektrofilní agonista). Z lineárního napěťového protokolu byly odečítány hodnoty na -100 a $+120$ mV (viz Obrázek 18B, str. 59) a pro porovnání mutací vůči WT TRPA1 byla odečítána průměrná hodnota šesti po sobě následujících proudových odpovědí snímaných v kontrolním roztoku a průměrná hodnota čtyř proudových odpovědí v přítomnosti agonisty na -100 mV a $+120$ mV. Na Obrázku 18C (str. 59) jsou vyobrazeny odpovědi mutovaných konstruktů a WT TRPA1 v ECS (kontrola) a v přítomnosti agonisty (AITC, karvakrol). V kontrole byla statisticky významně odlišná odpověď na $+120$ mV u S602D (Studentův t-test, $P = 0,006$; $n = 5$), S602D/K603A (Studentův t-test, $P < 0,001$; $n = 10$) a S602D/R604A ($P < 0,001$; $n = 7$). Na -100 mV byla proudová odpověď statisticky významně odlišná u konstruktů S602D/K603A (Studentův t-test, $P = 0,004$; $n = 10$) a S602D/R604A (Studentův t-test, $P = 0,021$; $n = 7$). V případě aplikace AITC došlo ke statisticky významné změně proudových odpovědí na $+120$ mV u konstruktů S602D/K603A (Studentův t-test, $P = 0,008$; $n = 5$) a S602D/R604A (Studentův t-test, $P = 0,039$; $n = 3$) a na -100 mV u S602D/K603A (Studentův t-test, $P = 0,008$; $n = 5$). Při aplikaci neelektrofilního agonisty karvakrolu byly statisticky významně odlišné odpovědi na $+120$ mV i $+100$ mV v případě S602D (Studentův t-test, $P = 0,002/P = 0,039$; $n = 3$), konstruktů S602D/K603A (Studentův t-test, $P = 0,036/P = 0,036$, $n = 5$), S602D/R604A (Studentův t-test, $P < 0,001/P = 0,002$; $n = 4$) a W605A (Studentův t-test, $P = 0,006/P = 0,006$; $n = 5$).



Obrázek 18: Charakterizace okolí Ser602 v přítomnosti agonistů. A) Strukturní vyobrazení oblasti Ser602 na podjednotce TRPA1 (PDB: 3J9P). Barevně jsou vyobrazeny postranní řetězce charakterizovaných aminokyselin. B) Proudové odpovědi jsou odečítány na -100 mV a $+120$ mV (šedé pruhy). Na prvním grafu je vyobrazena konkrétní proudová odpověď v kontrole (ECS, černá čára) a v agonistovi (modrá čára). Druhý graf vyobrazuje časovou závislost proudových odpovědí. Nad grafem je vyobrazena aplikace ECS a agonisty. Pro vyhodnocení jsou odečítány průměrné hodnoty proudových odpovědí před aplikací a v průběhu aplikace agonisty (černé šipky). C) Proudové odpovědi všech analyzovaných mutací a WT TRPA1 na $+120$ a -100 mV v kontrole (ECS, bílý graf) a v přítomnosti agonisty (AITC, červený graf; karvakrol, modrý graf). Červené hvězdičky označují statisticky významné mutace vůči WT TRPA1.

5. Diskuze

Fosforylace je jednou ze základních posttranslačních modifikací ovlivňujících funkci celé řady proteinů. V případě TRPA1 bylo publikováno několik studií, ve kterých byly popisovány experimenty, jejichž cílem bylo nalézt konkrétní kinasy působící na tento receptor a aminokyselinové zbytky modifikované fosforylací [93, 109, 113, 114]. Studium mechanismů fosforylace TRPA1 však není přímočaré, jelikož iontový kanál se při opakované nebo déletrvající aktivaci senzitivizuje a tento děj je dán vlastnostmi samotného proteinu. Tato senzitivizace (neboli postupné zvyšování proudových odpovědí při opakované nebo déletrvající aplikaci aktivátoru) může být chybně interpretována jako účinek fosforylace. V počáteční fázi experimentů jsme ověřovali míru senzitivizace pomocí „gap-free“ protokolu při opakované aktivaci karvakolem. Zjistili jsme, že senzitivizace je natolik významná, že by převyšovala očekávaný účinek modifikace receptoru fosforylací. Proto jsme na základě dříve publikovaných dat zvolili pro aktivaci receptoru napěťový protokol, který měl mít minimální vliv na zvyšování proudových odpovědí TRPA1 [109]. I přesto, že účinek nebyl tak výrazný jako v případě agonisty karvakrolu, v rozporu s uvedenou studií jsme senzitivizaci zaznamenali, a to především na kladných membránových potenciálech.

Z literatury je známo, že TRPA1 potřebuje ke své modulaci fosforylací přítomnost AKAP79 zakotvujícího proteinu, který na svém povrchu zakotvuje PKA, PKC a fosfátasu kalcineurin v blízkosti cílových substrátů [93]. Jaký vliv má samotný AKAP79 na aktivitu TRPA1 však doposud popsáno nebylo. Pro studium fosforylace TRPA1 prostřednictvím PKA nebo PKC bylo nutné provést sérii kontrolních pokusů, ve kterých jsme zjišťovali vliv AKAP79 na aktivitu TRPA1. Překvapivě jsme zjistili, že přítomnost AKAP79 ovlivňuje aktivitu TRPA1 na kladných i záporných potenciálech: na +120 mV dochází k postupnému zvyšování proudových odpovědí vůči kontrole a na -100 mV je zvýšena bazální hodnota proudových odpovědí, které již nemají tendenci se dále zvyšovat, jako je tomu v případě WT TRPA1 bez přítomnosti AKAP79. Naší hypotézou je, že účinek AKAP79 může být způsoben: a) přímou interakcí TRPA1 s AKAP79, b) zvýšenou bazální fosforylací TRPA1 (prostřednictvím endogenní PKA nebo PKC), nebo c) zvýšením povrchové exprese TRPA1 na cytoplazmatické membráně.

Receptor TRPA1 obsahuje více míst regulovaných kinasami – konkrétně byla studována regulace cyklin-dependentní kinasou 5 (Cdk5) [113, 114], PKA [93, 109] a PKC [93]. Různé skupiny zabývající se fosforylací TRPA1 postupovaly při výběru potenciálních fosforylačních míst odlišně. Ve studii zabývající se fosforylací PKA a PKC [93], kde také autoři potvrdili nutnost přítomnosti AKAP79 pro fosforylaci těmito kinasami, byly potenciální fosforylované aminokyselinové zbytky vybrány na základě tří predikčních serverů: pKaPS, NetPhosK1.0, KinasePhos2.0. Druhým atributem, který musela potenciální fosforylační místa splňovat, byla neměnnost daného rezidua u lidského, myšího a potkaního ortologu TRPA1. Pro fosforylaci PKC byly vytypovány aminokyseliny Ser87, Ser179, Ser318 a Ser1101 (číslováno podle sekvence proteinu z myši) a statisticky významné změny poskytl mutace S87A, která nevykazovala odpovědi na 8-Br-cAMP (aktivátor PKA). V případě PKC byly vybrány aminokyseliny Ser119, Tyr281, Ser441, Ser455, Tyr529 a Tyr536 přičemž mutace S119A, T281A a T529A zrušily citlivost TRPA1 na PKC aktivátor forbol-12,13-dibutyát. Experimenty byly však prováděny v roztocích obsahujících kalciové ionty (mutace byly zkoumány metodou „calcium imaging“) a je tedy možné, že výsledky ovlivňuje také působení Ca^{2+} na TRPA1.

Další laboratoř, která se snažila nalézt rezidua zodpovědná za fosforylaci TRPA1 pomocí PKA, použila pro výběr aminokyselin pouze řadu predikčních serverů – GPS2.1.1, NetPhosK, ScanSite 3, pKaPS a KinasePhos 2.0 [109]. Pomocí elektrofyziologických metod (opět v přítomnosti Ca^{2+}) autoři identifikovali Ser86, Ser317, Ser428 a Ser972 jako fosforylační místa pro PKA. Avšak řada z výše zmíněných potenciálních fosforylačních míst nebyla dána do strukturní souvislosti a například Ser972, určený jako fosforylační místo pro PKA, je zanořen hluboko ve struktuře v rámci „TRP-like“ helixu, a je tedy nepravděpodobné, že by toto místo bylo pro jakoukoliv kinasu přístupné. Obě tyto práce byly publikovány v počáteční fázi našich experimentů, což potvrdilo aktuálnost studované problematiky. V našem případě jsme se zaměřili na taková fosforylační místa, která splňují následující požadavky: místa jsou predikována minimálně dvěma použitými predikčními servery (GPS 5.0, NetPhos 3.1, NetPhorest 2.1) a zároveň se vyskytují v oblasti bohaté na SNP. Zároveň byly aminokyseliny vybírány tak, aby byly v rámci struktury proteinu TRPA1 na povrchu, a tedy přístupné pro kinasu.

Výsledkem těchto zvolených parametrů byly aminokyseliny Ser443, Ser602, Tyr670, Tyr673 a Ser1002, přičemž některé z těchto aminokyselin se vyskytují na nerozlišených

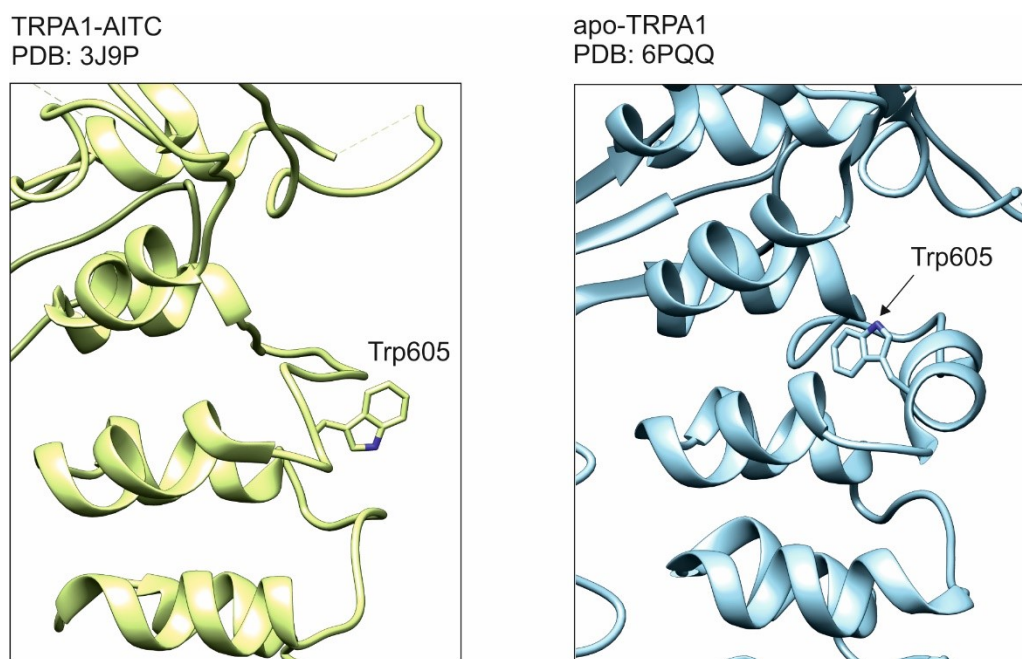
flexibilních raménkách, která mohou hrát významnou roli v převodu signálu (Tyr670, Tyr673). Serin 1002 se nachází v místě přechodu antiparalelně uspořádaných β -listů a flexibilního strukturně nerozlišeného raménka C-konce. V této oblasti se také nachází významné vazebné místo kalmulinu na TRPA1, který spolu s Ca^{2+} podle práce Hasana a spoluautorů [59] významně ovlivňuje funkci TRPA1. Nerozlišenou oblast C-konce, v rámci kterého se serin 1002 nachází, jsme modelovali metodou MDFF (viz kapitola 3.5.9, str. 39). Proudové odpovědi fosfomimikujícího mutantu S1002D byly podobné jako v případě S602D statisticky významně odlišné od WT TRPA1, toto reziduum však nebylo dále podrobně zkoumáno. Výsledky molekulárního modelování nejsou zařazeny v této předložené diplomové práci, ale jsou součástí publikace [54] (viz přehled publikací, Publikace 2 a 3).

Pro charakterizaci Tyr673 z hlediska fosforylace jsme se rozhodli mimo jiné z toho důvodu, že se v jedné z našich předchozích studií (o fosforylaci TRPA1 kinasou Cdk5 [114]) ukázal fosfomimikující mutant T673D významně senzitivizovaný oproti WT TRPA1. V našich současných experimentech však výsledky neprokázaly statisticky významnou změnu, a proto jsme se zaměřili na nejvýraznější účinek ze všech studovaných mutací, a to zrušení funkce TRPA1 v případě mutace S602D. Jako první jsme se pokusili charakterizovat míru exprese mutantu S602D na plazmatické membráně a porovnat ji vůči WT TRPA1. Zároveň jsme zjišťovali vliv přítomnosti AKAP79 na expresi WT TRPA1 na plazmatické membráně. Z našich výsledků konfokální mikroskopie (viz Obrázek 16, str. 56) lze usuzovat, že přítomnost AKAP79 pravděpodobně posiluje translokaci TRPA1 do membrány, zatímco v případě WT se kanály vyskytují převážně v těsné blízkosti cytoplazmatické membrány. Jejich translokaci do membrány může zapříčinit aktivace receptorů TRPA1, které se v membráně nacházejí za klidových podmínek [115]. Porovnání buněčné lokalizace WT TRPA1 a S602D ukazuje velmi podobnou distribuci a podporuje hypotézu, že S602D je skutečně exprimován na cytoplazmatické membráně. Důležitou součástí experimentů byla také optimalizace metody vizualizace plazmatické membrány. Většina dosud publikovaných výsledků využívajících konfokální mikroskopii neposkytuje přesvědčující a jasný důkaz o přítomnosti TRPA1 pouze na membráně, jelikož distribuce TRPA1 je obecně hojná v rámci celé buňky kromě jádra. Ve studii z roku 2019 [116] se autoři pokusili optimalizovat sledování TRPA1 na membráně pomocí značení buněk membránovou barvou CellBrite™ Fix následovaného sofistikovanou analýzou obrazových dat. V našich experimentech jsme se pokusili porovnat tuto metodu barvení se značením

membrány pomocí mCherry-PH, což je protein, který se váže na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány. Výhodou použití mCherry-PH bylo značení pouze specifických pozitivně transfekovaných buněk, kdežto v případě membránové barvy byly obarveny všechny buňky a silné pozadí tvořily výrazně nabarvené mrtvé části buněk. Další výhodou použití mCherry-PH je možnost sledování dynamických dějů v buňce, jak bylo již dříve popsáno v literatuře [117, 118]. Nevýhodou použití mCherry-PH je možná interference s expresí receptoru TRPA1 či možnost přímé funkční interakce s kanálem, což doposud žádná studie nedokázala ani nevyvrátila. Další nevýhodou je to, že signál mCherry-PH pozorujeme nejen na cytoplazmatické membráně, ale v menší míře také v celém objemu buňky, na rozdíl od membránové barvy, která specificky a dostatečně intenzivně značí pouze cytoplazmatickou membránu. Z našich výsledků tedy nelze jednoznačně preferovat jednu či druhou experimentální metodiku značení membrány, protože obě mají své pozitivní i negativní aspekty.

Dále jsme se zaměřili na strukturu v oblasti serinu 602. Pomocí metod molekulárního modelování byly vytvořeny mapy elektrostatického potenciálu, díky kterým jsme odhalili výrazné zmenšení kladného potenciálu v případě mutace S602D oproti WT TRPA1. Pro porovnání byla vytvořena simulace fosforylovaného stavu TRPA1, která vykazovala velmi podobný účinek snížení kladného potenciálu, který je v případě WT TRPA1 v oblasti Ser602 výrazný. Tento výsledek podpořil předpoklad, že mutace S602D skutečně může mimikovat fosforylovaný stav. Pro Ser602 a mutaci S602D byly vyhodnoceny kontakty s nejbližším strukturním okolím, z čehož jsme určili vedlejší Lys603 jako potenciální místo tvorby solného můstku s aspartátem na pozici 602, jelikož kontakty s tímto lysinem se ve struktuře S602D TRPA1 značně posilují – konkrétně z pěti kontaktů u WT TRPA1 (PDB: 3J9P) na 19 kontaktů u S602D (PDB: 3J9P). Výsledky MD prokazující možnost fosforylace Ser602 byly podpořeny elektrofyziologickými experimenty, jejichž cílem byla charakterizace vlivu mutací aminokyselinových zbytků v okolí serinu. Prvním krokem bylo vytvoření dvojmutací za účelem odhalení možných solných můstků s aspartátem na pozici 602: eliminace náboje argininu na pozici 604 zavedením mutace R604A do sekvence již obsahující S602D (to samé pro dvojmutaci S602D/K603A). Cílem bylo zjistit, zda některá z těchto dvojmutací nezruší efekt samotné mutace S602D, a tím potvrdí možnost existence solného můstku mezi studovanými aminokyselinami. Výsledky elektrofyziologických měření prokázaly, že oba konstrukty (S602D/K603A a S602D/R604A) vykazují stejný fenotyp jako S602D. Tvorba solného můstku je tedy

nepravděpodobná, což dále podporuje hypotézu fosforylace. Serin 602 byl následně zaměněn za asparagin, aby byl vyloučen kritický zásah do struktury záměnou serinu za aspartát. Mutace S602N se statisticky významně nelišila od WT TRPA1, lze tedy předpokládat, že účinek mutace S602D je způsobený vloženým nábojem. Poslední charakterizovanou mutací byla záměna Trp605 za alanin, protože se tento tryptofan nachází v oblasti predikované interakce s kalmodulinem (predikce byla provedena serverem Calmodulin Prediction Database [119]), ve které může mít úlohu hydrofobní kotvy pro jedno vazebné místo kalmodulinu [120]. V původní struktuře (PDB: 3J9P) je kanál zachycen v zavřeném stavu v přítomnosti agonistů a Trp605 je orientovaný směrem ven, avšak v nově publikovaných strukturách v rozdílných konformačních stavech (např. PDB: 6PQQ) je orientován směrem dovnitř struktury, tedy zdánlivě nepřístupný pro interakci s CaM (viz Obrázek 19, str. 64). Není však vyloučeno, že je pozice Trp605 stavově závislá a může být reorientována v závislosti na aktuálním konformačním stavu iontového kanálu.



Obrázek 19: Porovnání orientace Trp605 ve struktuře z roku 2015 (PDB: 3J9P) a z roku 2019 (PDB: 6PQQ). Ve struktuře 3J9P je tryptofan orientován ven, zatímco u všech publikovaných struktur z roku 2019 je orientován směrem dovnitř ankyrinů.

Jedním z našich kritérií výběru predikovaných míst potenciální fosforylace byl výskyt SNP v konsenzuální sekvenci (viz Obrázek 13B, str. 52). Abychom zjistili potenciální vliv okolních SNP na fosforylaci serinu 602, použili jsme program NetPhos 3.1. Tabulka 7 na straně 65 vyobrazuje takové jednonukleotidové záměny, které

snížily pravděpodobnost fosforylace Ser602. Nejvýraznější účinek má záměna argininu 604 za tyrosin. Klinické využití všech těchto výsledků je však zatím obtížné předvídat a vyžaduje další studium.

Serin 602 se nachází v blízkosti aktivační klíčky převádějící signál z vazebné kapsy pro elektrofilní agonisty do vrátek kanálu. Všechny mutace v oblasti tohoto rezidua byly proto charakterizovány v přítomnosti elektrofilního i neelektrofilního agonisty, abychom zjistili, zda nebyl mutacemi porušen jen jeden způsob aktivace receptoru. Z našich výsledků vyplývá, že záměna serinu 602 za aspartát způsobila spíše zásadní poruchu ve vrátkování kanálu než destabilizaci celé struktury.

Tabulka 7: *Výsledky predikce fosforylace Ser602 pro SNP snižující pravděpodobnost modifikace*

aminokyselina (SNP)	NetPhos 3.1	
	konsenzus	skóre (PKC)
WT (Ser602)	TIIRSKRWD	0,679
I599V	TVIRSKRWD	0,625
I599N	TNIRSKRWD	0,432
R604I	TIIRSKIWD	0,396
R604T	TIIRSKTWD	0,258

Předešlé studie ukazují, že fosforylace kinasami PKA a PKC mají za následek zvýšení aktivity receptoru TRPA1. Záměna S602D měla za následek úplné zrušení funkce kanálu, je tedy nepravděpodobné, že by za případnou fosforylací Ser602 byly zodpovědné tyto kinasy. Naše strukturně-funkční, modelovací i mikroskopické experimenty však naznačují, že se skutečně může jednat o účinek fosforylace, která má za následek zrušení aktivity receptoru. Další studium mechanismů fosforylace TRPA1 by se proto mohlo zaměřit na jiné skupiny predikovaných kinas. Podle řady predikčních programů by se mohlo jednat například o proteinkinasu B či MAP kinasy.

6. Závěr

- Pomocí elektrofyziologické metody *patch-clamp* jsme charakterizovali proudové odpovědi WT TRPA1 na opakovanou aplikaci neelektrofilního agonisty karvakrolu. Při aktivaci dochází k senzitivizaci neboli postupnému zvyšování proudových odpovědí, což by mohlo interferovat s účinkem fosforylace proteinu. Na základě těchto výsledků jsme optimalizovali dva napěťové protokoly, při kterých je senzitivizace výrazně nižší.
- Charakterizovali jsme proudové odpovědi WT TRPA1 v přítomnosti zakotvujícího proteinu AKAP79, který je nutný pro fosforylaci tohoto receptoru kinasami PKC a PKA. Zjistili jsme, že přítomnost AKAP79 zvyšuje bazální hodnoty proudových odpovědí na záporných potenciálech a výrazně senzitivizuje proudové odpovědi na kladných potenciálech v porovnání s WT TRPA1 bez přítomnosti AKAP79.
- Za využití tří predikčních serverů (GPS 5.0, NetPhos 3.1 a NetPhorest 2.1) jsme vybrali potenciální fosforylační místa pro proteinkinasy C – Ser443, Ser602, Tyr670, Tyr673 a Ser1002. Podmínky pro výběr aminokyselin byly následující – aminokyselinový zbytek je predikován minimálně dvěma ze tří použitých predikčních serverů, vyskytuje se v oblasti bohaté na jednonukleotidové polymorfismy a v rámci struktury je dostupný pro kinasu.
- Vybraná potenciálně fosforylovaná místa byla pomocí mutagenese úspěšně zaměněna za aspartát – tedy aminokyselinu mimikující fosforylovaný stav. V porovnání s WT TRPA1 byly statisticky významně zmenšeny proudové odpovědi u S602D a S1002D. Pro tyto aminokyseliny byla charakterizována záměna za neutrální krátký aminokyselinový zbytek, abychom vyloučili případný kritický zásah do struktury proteinu. V obou případech, S602G a S1002A, byly proudové odpovědi podobné WT TRPA1 – kritické narušení struktury bylo tímto vyloučeno.
- Strukturní úloha oblasti serinu 602 byla podrobně prozkoumána pomocí metod molekulárního modelování. Byla vytvořena struktura se záměnou

S602D a struktura s fosforylovaným serinem p-Ser602. Pro tyto struktury byly vytvořeny mapy elektrostatického potenciálu, ze kterých je patrné, že v případě fosfomimikující mutace i fosforylovaného stavu TRPA1 dochází k výraznému zmenšení kladného potenciálu v oblasti Ser602. Velmi podobné rozložení kladného náboje v oblasti S602D a p-Ser602 podporuje správnost volby aspartátu jako fosfomimikujícího rezidua.

- Pomocí konfokální mikroskopie jsme porovnali míru exprese WT TRPA1 bez a v přítomnosti zakotvujícího proteinu AKAP79 a konstruktu S602D v plazmatické membráně. Z pozorování lokalizace proteinů značených zeleným fluorescenčním proteinem jsme určili, že mutace S602D se na membráně exprimuje podobně jako TRPA1 a přítomnost AKAP79 pravděpodobně zvyšuje míru exprese TRPA1 na membráně.
- Elektrofyzilogickou technikou *patch-clamp* byly charakterizovány aminokyseliny v okolí serinu 602 – dvojmutace S602D/K603A, S602D/R604A, mutace W605A a S602N. Obě dvojmutace vykazovaly stejné zrušení funkce TRPA1 jako v případě S602D, nelze tedy předpokládat, že účinek mutace S602D je způsoben tvorbou solného můstku mezi těmito aminokyselinami. Neutralizace náboje S602N měla za následek obnovení funkce kanálu, což naznačuje, že příčinou zrušení funkce TRPA1 je vložení záporného náboje na pozici 602. Mutace W605A měla za následek snížení proudových odpovědí, což může souviset se strukturním zásahem do alosterické domény zodpovědné za aktivaci elektrofilními agonisty, která se nachází v těsné blízkosti.

Seznam použité literatury

1. Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S. a Patapoutian, A., ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. **112**:6, 819-29 (2003).
2. Bautista, D. M.; Jordt, S. E.; Nikai, T.; Tsuruda, P. R.; Read, A. J.; Poblete, J.; Yamoah, E. N.; Basbaum, A. I. a Julius, D., TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. **124**:6, 1269-82 (2006).
3. Kwan, K. Y.; Allchorne, A. J.; Vollrath, M. A.; Christensen, A. P.; Zhang, D. S.; Woolf, C. J. a Corey, D. P., TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. **50**:2, 277-89 (2006).
4. Kwan, K. Y.; Glazer, J. M.; Corey, D. P.; Rice, F. L. a Stucky, C. L., TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci*. **29**:15, 4808-19 (2009).
5. Nassini, R.; Materazzi, S.; Vriens, J.; Prenen, J.; Benemei, S.; De Siena, G.; la Marca, G.; Andre, E.; Preti, D.; Avonto, C.; Sadofsky, L.; Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Dussor, G.; Porreca, F.; Taglialatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Nilius, B. a Geppetti, P., The 'headache tree' via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain*. **135**:Pt 2, 376-90 (2012).
6. Jaquemar, D.; Schenker, T. a Trueb, B., An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem*. **274**:11, 7325-33 (1999).
7. El Karim, I. A.; Linden, G. J.; Curtis, T. M.; About, I.; McGahon, M. K.; Irwin, C. R.; Killough, S. A. a Lundy, F. T., Human dental pulp fibroblasts express the "cold-sensing" transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J Endod*. **37**:4, 473-8 (2011).
8. Shigetomi, E.; Tong, X.; Kwan, K. Y.; Corey, D. P. a Khakh, B. S., TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*. **15**:1, 70-80 (2011).
9. De Logu, F.; Nassini, R.; Materazzi, S.; Carvalho Goncalves, M.; Nosi, D.; Rossi Degl'Innocenti, D.; Marone, I. M.; Ferreira, J.; Li Puma, S.; Benemei, S.; Trevisan, G.; Souza Monteiro de Araujo, D.; Patacchini, R.; Bunnett, N. W. a Geppetti, P., Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun*. **8**:1, 1887 (2017).
10. Kochukov, M. Y.; McNearney, T. A.; Fu, Y. a Westlund, K. N., Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. **291**:3, C424-32 (2006).
11. Paulsen, C. E.; Armache, J. P.; Gao, Y.; Cheng, Y. a Julius, D., Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*. **520**:7548, 511-7 (2015).
12. Gaudet, R., TRP channels entering the structural era. *J Physiol*. **586**:Pt 15, 3565-75 (2008).
13. Clapham, D. E.; Runnels, L. W. a Strubing, C., The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. **2**:6, 387-96. (2001).

14. Levine, J. D. a Alessandri-Haber, N., TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. **1772**:8, 989-1003 (2007).
15. Armstrong, J. F.; Faccenda, E.; Harding, S. D.; Pawson, A. J.; Southan, C.; Sharman, J. L.; Campo, B.; Cavanagh, D. R.; Alexander, S. P. H.; Davenport, A. P.; Spedding, M. a Davies, J. A., The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2020: extending immunopharmacology content and introducing the IUPHAR/MMV Guide to MALARIA PHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res*. **48**:D1, D1006-D1021 (2020).
16. Gracheva, E. O. a Bagriantsev, S. N., Evolutionary adaptation to thermosensation. *Curr Opin Neurobiol*. **34**, 67-73 (2015).
17. Saito, S.; Saito, C. T.; Nozawa, M. a Tominaga, M., Elucidating the functional evolution of heat sensors among *Xenopus* species adapted to different thermal niches by ancestral sequence reconstruction. *Mol Ecol*. **28**:15, 3561-3571 (2019).
18. Cordero-Morales, J. F.; Gracheva, E. O. a Julius, D., Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**:46, E1184-91 (2011).
19. Gracheva, E. O.; Cordero-Morales, J. F.; Gonzalez-Carcacia, J. A.; Ingolia, N. T.; Manno, C.; Aranguren, C. I.; Weissman, J. S. a Julius, D., Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. *Nature*. **476**:7358, 88-91 (2011).
20. Kang, K.; Panzano, V. C.; Chang, E. C.; Ni, L.; Dainis, A. M.; Jenkins, A. M.; Regna, K.; Muskavitch, M. A. a Garrity, P. A., Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*. *Nature*. **481**:7379, 76-80 (2011).
21. Kohno, K.; Sokabe, T.; Tominaga, M. a Kadowaki, T., Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *J Neurosci*. **30**:37, 12219-29 (2010).
22. Saito, S.; Banzawa, N.; Fukuta, N.; Saito, C. T.; Takahashi, K.; Imagawa, T.; Ohta, T. a Tominaga, M., Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol Biol Evol*. **31**:3, 708-22 (2014).
23. Saito, S.; Nakatsuka, K.; Takahashi, K.; Fukuta, N.; Imagawa, T.; Ohta, T. a Tominaga, M., Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J Biol Chem*. **287**:36, 30743-54 (2012).
24. Saito, S. a Tominaga, M., Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. *Cell Calcium*. **57**:3, 214-21 (2015).
25. Bandell, M.; Story, G. M.; Hwang, S. W.; Viswanath, V.; Eid, S. R.; Petrus, M. J.; Earley, T. J. a Patapoutian, A., Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. **41**:6, 849-57 (2004).
26. Karashima, Y.; Talavera, K.; Everaerts, W.; Janssens, A.; Kwan, K. Y.; Vennekens, R.; Nilius, B. a Voets, T., TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**:4, 1273-8 (2009).
27. Kremeyer, B.; Lopera, F.; Cox, J. J.; Momin, A.; Rugiero, F.; Marsh, S.; Woods, C. G.; Jones, N. G.; Paterson, K. J.; Fricker, F. R.; Villegas, A.; Acosta, N.; Pineda-Trujillo, N. G.; Ramirez, J. D.; Zea, J.; Burley, M. W.; Bedoya, G.; Bennett, D. L.; Wood, J. N. a Ruiz-Linares, A., A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*. **66**:5, 671-80 (2010).

28. Viswanath, V.; Story, G. M.; Peier, A. M.; Petrus, M. J.; Lee, V. M.; Hwang, S. W.; Patapoutian, A. a Jegla, T., Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature*. **423**:6942, 822-3 (2003).
29. Hoffmann, T.; Kistner, K.; Miermeister, F.; Winkelmann, R.; Wittmann, J.; Fischer, M. J.; Weidner, C. a Reeh, P. W., TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain*. **17**:10, 1472-82 (2013).
30. Vandewauw, I.; De Clercq, K.; Mulier, M.; Held, K.; Pinto, S.; Van Ranst, N.; Segal, A.; Voet, T.; Vennekens, R.; Zimmermann, K.; Vriens, J. a Voets, T., A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*. **555**:7698, 662-666 (2018).
31. Yarmolinsky, D. A.; Peng, Y.; Pogorzala, L. A.; Rutlin, M.; Hoon, M. A. a Zuker, C. S., Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron*. **92**:5, 1079-1092 (2016).
32. del Camino, D.; Murphy, S.; Heiry, M.; Barrett, L. B.; Earley, T. J.; Cook, C. A.; Petrus, M. J.; Zhao, M.; D'Amours, M.; Deering, N.; Brenner, G. J.; Costigan, M.; Hayward, N. J.; Chong, J. A.; Fanger, C. M.; Woolf, C. J.; Patapoutian, A. a Moran, M. M., TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci*. **30**:45, 15165-74 (2010).
33. Sawada, Y.; Hosokawa, H.; Matsumura, K. a Kobayashi, S., Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci*. **27**:5, 1131-42 (2008).
34. Chen, J.; Kang, D.; Xu, J.; Lake, M.; Hogan, J. O.; Sun, C.; Walter, K.; Yao, B. a Kim, D., Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun*. **4**, 2501 (2013).
35. Jordt, S. E.; Bautista, D. M.; Chuang, H. H.; McKemy, D. D.; Zygmunt, P. M.; Hogestatt, E. D.; Meng, I. D. a Julius, D., Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. **427**:6971, 260-5 (2004).
36. Knowlton, W. M.; Bifolck-Fisher, A.; Bautista, D. M. a McKemy, D. D., TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain*. **150**:2, 340-50 (2010).
37. Zurborg, S.; Yurgionas, B.; Jira, J. A.; Caspani, O. a Heppenstall, P. A., Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci*. **10**:3, 277-9 (2007).
38. Sinica, V.; Zimova, L.; Barvikova, K.; Macikova, L.; Barvik, I. a Vlachova, V., Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*. **9**:1 (2019).
39. Barvíková, K., Studium teplotní citlivosti lidského TRPA1 kanálu., 60 (2018).
40. Marsakova, L.; Barvik, I.; Zima, V.; Zimova, L. a Vlachova, V., The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel. *Front Mol Neurosci*. **10**, 16 (2017).
41. Zimova, L.; Sinica, V.; Kadkova, A.; Vyklicka, L.; Zima, V.; Barvik, I. a Vlachova, V., Intracellular cavity of sensor domain controls allosteric gating of TRPA1 channel. *Sci Signal*. **11**:514 (2018).
42. Suo, Y.; Wang, Z.; Zubcevic, L.; Hsu, A. L.; He, Q.; Borgnia, M. J.; Ji, R. R. a Lee, S. Y., Structural insights into Electrophile Irritant Sensing by the human TRPA1 channel. *Neuron*. **105** (2020).
43. Zhao, J.; King Lin, J. V.; Paulsen, C. E.; Cheng, Y. a Julius, D., Mechanisms governing irritant-evoked activation and calcium modulation of TRPA1. *bioRxiv*. (2019).

44. Palovcak, E.; Delemotte, L.; Klein, M. L. a Carnevale, V., Evolutionary imprint of activation: the design principles of VSDs. *J Gen Physiol.* **143**:2, 145-56 (2014).
45. Macikova, L.; Sinica, V.; Kadkova, A.; Villette, S.; Ciaccafava, A.; Faherty, J.; Lecomte, S.; Alves, I. D. a Vlachova, V., Putative interaction site for membrane phospholipids controls activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials. *FEBS J.* **286**:18, 3664-3683 (2019).
46. Hu, H.; Bandell, M.; Petrus, M. J.; Zhu, M. X. a Patapoutian, A., Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol.* **5**:3, 183-90 (2009).
47. Meents, J. E.; Ciotu, C. I. a Fischer, M. J. M., TRPA1: a molecular view. *J Neurophysiol.* **121**:2, 427-443 (2019).
48. Xiao, B.; Dubin, A. E.; Bursulaya, B.; Viswanath, V.; Jegla, T. J. a Patapoutian, A., Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci.* **28**:39, 9640-51 (2008).
49. Meents, J. E.; Fischer, M. J. a McNaughton, P. A., Agonist-induced sensitisation of the irritant receptor ion channel TRPA1. *J Physiol.* (2016).
50. Gui, J.; Liu, B.; Cao, G.; Lipchik, A. M.; Perez, M.; Dekan, Z.; Mobli, M.; Daly, N. L.; Alewood, P. F.; Parker, L. L.; King, G. F.; Zhou, Y.; Jordt, S. E. a Nitabach, M. N., A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain. *Curr Biol.* **24**:5, 473-83 (2014).
51. Rohacs, T., Phosphoinositide regulation of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol.* **223**, 1143-76 (2014).
52. Rohacs, T., Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Adv Biol Regul.* **53**:3, 341-55 (2013).
53. Rohacs, T., Phosphoinositide signaling in somatosensory neurons. *Adv Biol Regul.* **61**, 2-16 (2016).
54. Zimova, L.; Barvikova, K.; Macikova, L.; Vyklicka, L.; Sinica, V.; Barvik, I. a Vlachova, V., Proximal C-Terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation via Its Interacting Molecules and Supramolecular Complexes. *Front Physiol.* **11**, 189 (2020).
55. Gaudet, R., A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst.* **4**:5, 372-9 (2008).
56. Bahia, P. K.; Parks, T. A.; Stanford, K. R.; Mitchell, D. A.; Varma, S.; Stevens, S. M., Jr. a Taylor-Clark, T. E., The exceptionally high reactivity of Cys 621 is critical for electrophilic activation of the sensory nerve ion channel TRPA1. *J Gen Physiol.* **147**:6, 451-65 (2016).
57. Hinman, A.; Chuang, H. H.; Bautista, D. M. a Julius, D., TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:51, 19564-8 (2006).
58. Macpherson, L. J.; Dubin, A. E.; Evans, M. J.; Marr, F.; Schultz, P. G.; Cravatt, B. F. a Patapoutian, A., Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature.* **445**:7127, 541-5 (2007).
59. Hasan, R.; Leeson-Payne, A. T.; Jaggar, J. H. a Zhang, X., Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci Rep.* **7**, 45098 (2017).
60. Sura, L.; Zima, V.; Marsakova, L.; Hynkova, A.; Barvik, I. a Vlachova, V., C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca²⁺-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *J Biol Chem.* **287**:22, 18067-77 (2012).

61. Cvetkov, T. L.; Huynh, K. W.; Cohen, M. R. a Moiseenkova-Bell, V. Y., Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J Biol Chem.* **286**:44, 38168-76 (2011).
62. Chen, X.; Wang, Q.; Ni, F. a Ma, J., Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:25, 11352-7 (2010).
63. Zayats, V.; Samad, A.; Minofar, B.; Roelofs, K. E.; Stockner, T. a Ettrich, R., Regulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by its N-terminal ankyrin repeat domain. *J Mol Model.* **19**:11, 4689-700 (2013).
64. Zima, V.; Witschas, K.; Hynkova, A.; Zimova, L.; Barvik, I. a Vlachova, V., Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology.* **93**, 294-307 (2015).
65. Badsberg, U.; Jorgensen, A. M.; Gesmar, H.; Led, J. J.; Hammerstad, J. M.; Jespersen, L. L. a Ulstrup, J., Solution structure of reduced plastocyanin from the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Biochemistry.* **35**:22, 7021-31 (1996).
66. Korndorfer, I. P.; Brueckner, F. a Skerra, A., The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol.* **370**:5, 887-98 (2007).
67. Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T. a MacKinnon, R., The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* **280**:5360, 69-77 (1998).
68. Baraldi, P. G.; Preti, D.; Materazzi, S. a Geppetti, P., Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. *J Med Chem.* **53**:14, 5085–5107 (2010).
69. Zygmunt, P. M. a Hogestatt, E. D., Trpa1. *Handb Exp Pharmacol.* **222**, 583-630 (2014).
70. Talavera, K.; Startek, J. B.; Alvarez-Collazo, J.; Boonen, B.; Alpizar, Y. A.; Sanchez, A.; Naert, R. a Nilius, B., Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: from structure to disease. *Physiol Rev.* (2019).
71. Gifford, J. L.; Walsh, M. P. a Vogel, H. J., Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J.* **405**:2, 199-221 (2007).
72. Wang, Y. Y.; Chang, R. B.; Waters, H. N.; McKemy, D. D. a Liman, E. R., The Nociceptor Ion Channel TRPA1 Is Potentiated and Inactivated by Permeating Calcium Ions. *J Biol Chem.* **283**:47, 32691-703 (2008).
73. Yoshida, T.; Inoue, R.; Morii, T.; Takahashi, N.; Yamamoto, S.; Hara, Y.; Tominaga, M.; Shimizu, S.; Sato, Y. a Mori, Y., Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol.* **2**:11, 596-607 (2006).
74. Macpherson, L. J.; Geierstanger, B. H.; Viswanath, V.; Bandell, M.; Eid, S. R.; Hwang, S. a Patapoutian, A., The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol.* **15**:10, 929-34 (2005).
75. Andersson, D. A.; Gentry, C.; Moss, S. a Bevan, S., Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* **28**:10, 2485-94 (2008).
76. Takahashi, N.; Mizuno, Y.; Kozai, D.; Yamamoto, S.; Kiyonaka, S.; Shibata, T.; Uchida, K. a Mori, Y., Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels.* **2**:4, 287-98 (2008).

77. Taylor-Clark, T. E.; Undem, B. J.; Macglashan, D. W., Jr.; Ghatta, S.; Carr, M. J. a McAlexander, M. A., Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol.* **73**:2, 274-81 (2008).
78. Bautista, D. M.; Siemens, J.; Glazer, J. M.; Tsuruda, P. R.; Basbaum, A. I.; Stucky, C. L.; Jordt, S. E. a Julius, D., The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* **448**:7150, 204-8 (2007).
79. Karashima, Y.; Damann, N.; Prenen, J.; Talavera, K.; Segal, A.; Voets, T. a Nilius, B., Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci.* **27**:37, 9874-84 (2007).
80. Xu, H.; Dellling, M.; Jun, J. C. a Clapham, D. E., Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* **9**:5, 628-35 (2006).
81. Talavera, K.; Gees, M.; Karashima, Y.; Meseguer, V. M.; Vanoirbeek, J. A.; Damann, N.; Everaerts, W.; Benoit, M.; Janssens, A.; Vennekens, R.; Viana, F.; Nemery, B.; Nilius, B. a Voets, T., Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci.* **12**:10, 1293-9 (2009).
82. Ohara, K.; Fukuda, T.; Okada, H.; Kitao, S.; Ishida, Y.; Kato, K.; Takahashi, C.; Katayama, M.; Uchida, K. a Tominaga, M., Identification of significant amino acids in multiple transmembrane domains of human transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) for activation by eudesmol, an oxygenized sesquiterpene in hop essential oil. *J Biol Chem.* **290**:5, 3161-71 (2015).
83. Nagatomo, K. a Kubo, Y., Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**:45, 17373-8 (2008).
84. Kadkova, A.; Synytsya, V.; Krusek, J.; Zimova, L. a Vlachova, V., Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiol Res.* **66**:3, 425-439 (2017).
85. Dai, Y.; Wang, S.; Tominaga, M.; Yamamoto, S.; Fukuoka, T.; Higashi, T.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Yamanaka, H. a Noguchi, K., Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest.* **117**:7, 1979-87 (2007).
86. Wang, S.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Cui, X.; Tominaga, M. a Noguchi, K., Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* **131**:Pt 5, 1241-51 (2008).
87. Tan, C. S. H., Databases and Computational Tools for Evolutionary Analysis of Protein Phosphorylation. *Methods Mol Biol.* **1636**, 475-484 (2017).
88. Trost, B.; Kusalik, A. a Napper, S., Computational Analysis of the Predicted Evolutionary Conservation of Human Phosphorylation Sites. *PloS one.* **11**:4, e0152809 (2016).
89. Patil, M. J.; Salas, M.; Bialuhin, S.; Boyd, J. T.; Jeske, N. A. a Akopian, A. N., Sensitization of small-diameter sensory neurons is controlled by TRPV1 and TRPA1 association. *FASEB J.* **34**:1, 287-302 (2020).
90. Bolcskei, K.; Helyes, Z.; Szabo, A.; Sandor, K.; Elekes, K.; Nemeth, J.; Almasi, R.; Pinter, E.; Petho, G. a Szolcsanyi, J., Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain.* **117**:3, 368-76 (2005).

91. Patil, M. J.; Jeske, N. A. a Akopian, A. N., Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. *Neuroscience*. **171**:4, 1109-19 (2010).
92. Weng, H. J.; Patel, K. N.; Jeske, N. A.; Bierbower, S. M.; Zou, W.; Tiwari, V.; Zheng, Q.; Tang, Z.; Mo, G. C.; Wang, Y.; Geng, Y.; Zhang, J.; Guan, Y.; Akopian, A. N. a Dong, X., Tmem100 Is a Regulator of TRPA1-TRPV1 Complex and Contributes to Persistent Pain. *Neuron*. **85**:4, 833-46 (2015).
93. Brackley, A. D.; Gomez, R.; Guerrero, K. A.; Akopian, A. N.; Glucksman, M. J.; Du, J.; Carlton, S. M. a Jeske, N. A., A-Kinase Anchoring Protein 79/150 Scaffolds Transient Receptor Potential A 1 Phosphorylation and Sensitization by Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Sci Rep*. **7**:1, 1842 (2017).
94. Rosenbaum, T.; Gordon-Shaag, A.; Munari, M. a Gordon, S. E., Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol*. **123**:1, 53-62 (2004).
95. Ufret-Vincenty, C. A.; Klein, R. M.; Hua, L.; Angueyra, J. a Gordon, S. E., Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. *J Biol Chem*. **286**:11, 9688-98 (2011).
96. Klauck, T. M.; Faux, M. C.; Labudda, K.; Langeberg, L. K.; Jaken, S. a Scott, J. D., Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science*. **271**:5255, 1589-92 (1996).
97. Petho, G. a Reeh, P. W., Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev*. **92**:4, 1699-775 (2012).
98. Zhang, X.; Li, L. a McNaughton, P. A., Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*. **59**:3, 450-61 (2008).
99. Miyano, K.; Shiraishi, S.; Minami, K.; Sudo, Y.; Suzuki, M.; Yokoyama, T.; Terawaki, K.; Nonaka, M.; Murata, H.; Higami, Y. a Uezono, Y., Carboplatin Enhances the Activity of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 through the Cyclic AMP-Protein Kinase A-A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Pathways. *Int J Mol Sci*. **20**:13 (2019).
100. Patel, N.; Stengel, F.; Aebersold, R. a Gold, M. G., Molecular basis of AKAP79 regulation by calmodulin. *Nat Commun*. **8**:1, 1681 (2017).
101. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B. a Sigworth, F. J., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. **391**:2, 85-100 (1981).
102. Dittert, I.; Benedikt, J.; Vyklicky, L.; Zimmermann, K.; Reeh, P. W. a Vlachova, V., Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods*. **151**:2, 178-85 (2006).
103. Evdokimov, A. G.; Pokross, M. E.; Egorov, N. S.; Zaraisky, A. G.; Yampolsky, I. V.; Merzlyak, E. M.; Shkoporov, A. N.; Sander, I.; Lukyanov, K. A. a Chudakov, D. M., Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep*. **7**:10, 1006-12 (2006).
104. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L. a Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. **26**:16, 1781-802 (2005).
105. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R. a Schwede, T., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. **46**:W1, W296-W303 (2018).

106. Theoretical and Computational Biophysics Group: Molecular Dynamics Flexible Fitting. Dostupné z URL:
<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/science/mdff/tutorial_mdff.pdf> [cit. 15. 3. 2019]
107. Humphrey, W.; Dalke, A. a Schulten, K., VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. **14**:1, 33-38 (1996).
108. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C. a Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. **25**:13, 1605-12 (2004).
109. Meents, J. E.; Fischer, M. J. a McNaughton, P. A., Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PloS one*. **12**:1, e0170097 (2017).
110. Xue, Y.; Ren, J.; Gao, X.; Jin, C.; Wen, L. a Yao, X., GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics*. **7**:9, 1598-608 (2008).
111. Blom, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S. a Brunak, S., Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. **4**:6, 1633-49 (2004).
112. Horn, H.; Schoof, E. M.; Kim, J.; Robin, X.; Miller, M. L.; Diella, F.; Palma, A.; Cesareni, G.; Jensen, L. J. a Linding, R., KinomeXplorer: an integrated platform for kinome biology studies. *Nat Methods*. **11**:6, 603-4 (2014).
113. Sulak, M. A.; Ghosh, M.; Sinharoy, P.; Andrei, S. R. a Damron, D. S., Modulation of TRPA1 channel activity by Cdk5 in sensory neurons. *Channels*. **12**:1, 65-75 (2018).
114. Hynkova, A.; Marsakova, L.; Vaskova, J. a Vlachova, V., N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel. *Sci Rep*. **6**, 28700 (2016).
115. Schmidt, M.; Dubin, A. E.; Petrus, M. J.; Earley, T. J. a Patapoutian, A., Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*. **64**:4, 498-509 (2009).
116. Startek, J. B.; Boonen, B.; Lopez-Requena, A.; Talavera, A.; Alpizar, Y. A.; Ghosh, D.; Van Ranst, N.; Nilius, B.; Voets, T. a Talavera, K., Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. *Elife*. **8** (2019).
117. Lukacs, V.; Thyagarajan, B.; Varnai, P.; Balla, A.; Balla, T. a Rohacs, T., Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci*. **27**:26, 7070-80 (2007).
118. Marsakova, L.; Touska, F.; Krusek, J. a Vlachova, V., Pore Helix Domain Is Critical to Camphor Sensitivity of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel. *Anesthesiology*. **116**:4, 903-917 (2012).
119. Yap, K. L.; Kim, J.; Truong, K.; Sherman, M.; Yuan, T. a Ikura, M., Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics*. **1**:1, 8-14 (2000).
120. Tidow, H. a Nissen, P., Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS J*. **280**:21, 5551-65 (2013).

Přehled publikací

- 1) Máčiková, L.; **Barvíková**, K. a Vlachova, V.,
Receptor pro hořčici je místem účinku paracetamolu.
Bolest. **21**:4, 131-138 (2018).
- 2) Sinica, V.; Zimova, L.; **Barvikova**, K.; Macikova, L.; Barvik, I. a Vlachova, V.,
Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by
Voltage.
Cells. **9**:1 (2019).
- 3) Zimova, L.; **Barvikova**, K.; Macikova, L.; Vyklicka, L.; Sinica, V.; Barvik, I.
a Vlachova, V.,
Proximal C-Terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation
via Its Interacting Molecules and Supramolecular Complexes.
Front Physiol. **11**: 189 (2020).

Publikace 1

Máčíková, L.; **Barvíková**, K. a Vlachova, V,

Receptor pro hořčici je místem účinku paracetamolu.

Bolest. **21**:4, 131-138 (2018).

Publikace 2

Sinica, V.; Zimova, L.; **Barvikova, K.**; Macikova, L.; Barvik, I. a Vlachova, V.,
Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage.
Cells. **9**:1 (2019).

Publikace 3

Zimova, L.; **Barvikova**, K.; Macikova, L.; Vyklicka, L.; Sinica, V.; Barvik, I.
a Vlachova, V,

Proximal C-Terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation via Its
Interacting Molecules and Supramolecular Complexes.

Front Physiol. **11**: 189 (2020).